

Aus der Klinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

**Funktionelle und strukturelle Charakterisierung varianter  
Mevalonatkinase Proteine**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lukas Reitzle

aus

Würzburg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatlerin: Prof. Dr. med. Ania C. Muntau

Mitberichterstatler: Prof. Dr. med. Benedikt Schoser  
Prof. Dr. med. Michael Vogeser

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Søren W. Gersting

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 ALTERN, ALZHEIMER UND ANDERE STÖRUNGEN DER PROTEINHOMÖOSTASE.....	1
1.2 MEVALONATKINASE-DEFIZIENZ.....	2
1.2.1 Hintergrund und klinische Präsentation .....	2
1.2.2 Epidemiologie und Genetik.....	3
1.2.3 Funktion und Struktur des Mevalonatkinase Proteins.....	5
1.2.4 Auswirkungen von Mutationen auf das Mevalonatkinase Protein .....	7
1.2.5 Konsequenzen für den zellulären Metabolismus.....	8
1.2.6 Autoinflammation und die Bedeutung von Interleukin-1 $\beta$ .....	9
1.2.7 Diagnostik und Therapie .....	12
<b>2 FRAGESTELLUNG.....</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIAL .....</b>	<b>18</b>
3.1 PLASMIDE UND VEKTOREN .....	18
3.2 BAKTERIENSTÄMME.....	18
3.3 REAGENZIENSÄTZE (KITS).....	18
3.4 CHEMIKALIEN .....	18
3.4.1 Allgemeine Chemikalien.....	18
3.4.2 Klonierung und Proteinproduktion.....	19
3.4.3 BN-PAGE und Western Blot.....	20
3.4.4 DSF, RALS und Unfolding kinetics.....	20
3.4.5 Enzymaktivitätsassay .....	21
3.5 PUFFER UND LÖSUNGEN.....	21
3.5.1 Klonierung und Proteinproduktion.....	21
3.5.2 BN-PAGE und Western Blot.....	21
3.5.3 Enzymaktivitätsassay .....	22
3.6 VERBRAUCHSMITTEL .....	22
3.7 GERÄTE .....	23
3.8 SOFTWARE.....	24

<b>4</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>25</b>
4.1	ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN METHODEN .....	25
4.1.1	Klonierung und Einführung der Mutationen in das <i>MVK</i> -Gen .....	26
4.1.2	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> und Anlage von Dauerkulturen .....	27
4.1.3	<i>Site-directed mutagenesis</i> .....	27
4.1.4	Klonierung mittels Gateway System® .....	28
4.1.5	Transformation in <i>Escherichia coli</i> .....	29
4.1.6	DNA-Isolierung aus <i>Escherichia coli</i> .....	30
4.1.7	Restriktionsverdau der Plasmid-DNA .....	30
4.2	PROTEINPRODUKTION UND –AUFREINIGUNG .....	31
4.2.1	Proteinproduktion in <i>Escherichia coli</i> .....	31
4.2.2	Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie .....	32
4.2.3	<i>Size-exclusion chromatography</i> .....	32
4.2.4	Abspaltung des <i>maltose-binding protein tags</i> .....	33
4.3	<i>BLUE NATIVE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS</i> .....	34
4.4	WESTERN BLOT.....	34
4.5	<i>DIFFERENTIAL SCANNING FLUORIMETRY</i> .....	35
4.6	<i>RIGHT ANGLE LIGHT SCATTERING</i> .....	36
4.7	<i>PROTEIN UNFOLDING KINETICS</i> .....	36
4.8	MEVALONATKINASE ENZYMAKTIVITÄTSASSAY .....	37
4.8.1	Enzymatische Reaktion von Mevalonat zu Mevalonat-5-Phosphat .....	38
4.8.2	Quantifizierung von Mevalonat-5-Phosphat mittels <i>isotope dilution</i> Tandem-Massenspektrometrie .....	38
4.8.3	Validierung der Tandem-Massenspektrometrie .....	40
4.8.4	Berechnung der kinetischen Parameter .....	41
4.9	GENOTYP, PHÄNOTYP UND RESIDUALE ENZYMAKTIVITÄT .....	41
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>43</b>
5.1	AUSWIRKUNGEN VON MUTATIONEN IM <i>MVK</i> -GEN AUF DIE NATIVE STRUKTUR DER MEVALONATKINASE .....	43
5.1.1	Strukturelle Visualisierung der untersuchten Mutationen .....	43
5.1.2	Oligomerisierung des Mevalonatkinase Wildtyps.....	45
5.1.3	Oligomerisierung varianter Mevalonatkinase .....	47
5.2	THERMODYNAMISCHE STABILITÄT VARIANTER MEVALONATKINASE PROTEINE.....	50
5.2.1	Entfaltung varianter Mevalonatkinase in Abhängigkeit von der Temperatur .....	50
5.2.2	Aggregationsverhalten der varianten Mevalonatkinase Proteine .....	52
5.2.3	Kinetische Untersuchung der varianten Mevalonatkinase Proteine .....	54

5.3	EINFLUSS VON MUTATIONEN AUF DIE FUNKTIONELLEN EIGENSCHAFTEN DER MEVALONATKINASE .....	56
5.3.1	Entwicklung eines neuen, auf Tandem-Massenspektrometrie basierendem Mevalonatkinase Aktivitätsassays .....	56
5.3.2	Bestimmung der spezifischen Aktivität varianter Mevalonatkinase .....	59
5.3.3	Residuale Mevalonatkinase Aktivität in Abhängigkeit vom Genotyp .....	62
5.4	KORRELATION DER EXPERIMENTELLEN ERGEBNISSE MIT DEM KLINISCHEN PHÄNOTYP .....	64
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>66</b>
6.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE .....	66
6.2	ANGEBORENE STOFFWECHSELERKRANKUNGEN UND PROTEINFEHLFALTUNG .....	68
6.3	MUTATIONEN FÜHREN ZUR BEEINTRÄCHTIGUNG DER NATIVEN PROTEINSTRUKTUR.....	68
6.4	VARIANTE PROTEINE ZEIGEN EINE VERRINGERTE THERMODYNAMISCHE STABILITÄT.....	70
6.5	MUTATIONEN FÜHREN ZUR FUNKTIONELLE BEEINTRÄCHTIGUNG .....	71
6.6	NEUE ERKENNTNISSE ZUR MUTATIONSSPEZIFISCHEN PATHOPHYSIOLOGIE ERMÖGLICHEN EINE DETAILLIERTE GENOTYP-PHÄNOTYP-KORRELATION.....	73
6.6.1	<i>Loss-of-function</i> aufgrund starker struktureller Beeinträchtigung (Gruppe 1) .....	74
6.6.2	<i>Loss-of-function</i> aufgrund eingeschränkter katalytischer Aktivität (Gruppe 2) .....	75
6.6.3	<i>Loss-of-function</i> aufgrund eingeschränkter konformationeller Stabilität bei Erhalt der funktionellen Enzymaktivität (Gruppe 3).....	76
6.6.4	Modifikation der Genotyp-Phänotyp-Korrelation durch interallelische Komplementation .....	77
6.7	KONSEQUENZEN FÜR DIE PHARMAKOLOGISCHE THERAPIE.....	79
6.7.1	Entwicklung von pharmakologischen Chaperonen .....	79
6.7.2	Stellenwert der anti-inflammatorischen Therapie .....	81
6.8	BEDEUTUNG UND CHANCEN DES NEUEN MVK-AKTIVITÄTSASSAYS.....	82
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>98</b>
<b>10</b>	<b>WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE.....</b>	<b>99</b>
10.1	PUBLIKATIONEN .....	99
10.2	ABSTRACTS .....	99

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ANS	1-Anilinonaphthalene-8-Sulfonsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BN-PAGE	<i>Blue native polyacrylamide gel electrophoresis</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD	<i>Circular dichroism</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CF	Zystische Fibrose
CRP	C-reaktives Protein
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DSF	<i>Differential scanning fluorimetry</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FOH	Farnesol
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FPP	Farnesyl-Pyrophosphat
GGOH	Geranylgeraniol
GHMP	<i>Galactokinase/homoserine kinase/mevalonate kinase/phosphomevalonate kinase</i>
GPP	Geranyl-Pyrophosphat
GTPase	<i>Small guanosine triphosphatases</i>
HCl	Chlorwasserstoff
HIDS	Hyper-Immunoglobulin D-Syndrom
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
HPLC-MS/MS	<i>High performance liquid chromatography</i> gefolgt von Tandem-Massenspektrometrie
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>

IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
IPTG	<i>Isopropylthio-b-D-galactoside</i>
LOQ	<i>Lower limit of quantification</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MA	Mevalonazidurie
MAS	Makrophagenaktivierungssyndrom
MCAD	Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase
MCADD	Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz
Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MKD	Mevalonatkinase-Defizienz
MVA	Mevalonsäure/ Mevalonat
MVAP	Mevalonat-5-Phosphat
MVAPP	Mevalonat-Pyrophosphat
MVK	Mevalonatkinase
NLRP3	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i>
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OD	Optische Dichte
OMIM	<i>Online mendelian inheritance in man</i> (Datenbank)
PAH	Phenylalaninhydroxylase
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKB	Proteinkinase B
PKU	Phenylketonurie
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RALS	<i>Right angle light scattering</i>
RhoA	<i>Ras homolog family member A</i>
SAA	Serum Amyloid A
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>

THP-1	Humane monozytäre Zelllinie von einem Patienten akuter Leukämie
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNFRSF1A	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRAPS	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1-assoziiertes periodisches Syndrom
TRIS	2-Amino-2-Hydroxymethyl-Propan-1,3-diol
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
UPLC-MS/MS	<i>Ultra performance liquid chromatography</i> gefolgt von Tandem-Massenspektrometrie



# 1 Einleitung

## 1.1 Altern, Alzheimer und andere Störungen der Proteinhomöostase

Für die Funktion der Zelle des menschlichen Körpers sind Proteine unerlässlich. Sie sind Grundbausteine für die Struktur und die Ausübung biologischer Funktionen. Um den vielen Ansprüchen gerecht zu werden, gibt es über 20.000 Proteine von simpler bis höchster Komplexität. Die Proteine befinden sich in einem ständigen Gleichgewicht zwischen Neusynthese, Faltung, Entfaltung und Degradation, der Proteinhomöostase (Proteostase). Dabei sind sie Herausforderungen genetischer Natur (z.B. Mutationen), sowie umweltbezogener Natur (z.B. pH und Temperatur) ausgesetzt (Balch, Morimoto et al. 2008). Für die Funktion der Proteine ist eine korrekte Faltung unerlässlich. Die Proteostase wird durch ein hochgradig komplexes Netzwerk aus mehr als 1.000 Proteinen aufrechterhalten (Kim, Hipp et al. 2013). Dieses Netzwerk besteht unter anderem aus sogenannten Chaperonen, die neu synthetisierte Proteine bei der Faltung unterstützen, fehlgefaltete Proteine in die korrekte Konformation überführen und eine qualitätssichernde Funktion ausüben (Hartl, Bracher et al. 2011). Neben der Erhaltung der korrekt gefalteten Proteine garantiert das Proteostase-Netzwerk auch den geordneten Abbau von unwiderruflich fehlgefalteten und aggregierten Proteinen im Proteasom sowie durch Autophagie im Lysosom. Die Erhaltung dieses Gleichgewichts ist essenziell für die Funktion des Organismus und eine Störung der Proteostase kann zu Krankheit führen (Powers, Morimoto et al. 2009). Mit zunehmendem Alter nimmt die Aktivität dieses Netzwerkes ab und speziell die Beseitigung akkumulierter und aggregierter Proteine bereitet dem Organismus zunehmend Schwierigkeiten. Dies trägt zur Entstehung altersassoziierter neurologischer Erkrankungen, wie der Alzheimer-Erkrankung, dem Morbus Parkinson und der Chorea Huntington bei (Vilchez, Saez et al. 2014).

Grundlegend lassen sich bei Störungen der Proteostase zwei verschiedene Pathomechanismen unterscheiden. Einerseits kann es zu *gain-of-function* (Funktionszugewinn) oder andererseits zu *loss-of-function* (Funktionsverlust) kommen. Bei der familiären Form der Alzheimer-Erkrankung beispielsweise führen Mutationen in einem oder mehreren Genen durch *gain-of-function* zu Ablagerungen und Aggregation von vormalig löslichen Amyloid-Peptiden und damit zum Absterben von Neuronen (Hardy and Selkoe 2002). Im Falle der zystischen

Fibrose (CF) kommt es im Rahmen von Mutationen im *CFTR*-Gen zu *loss-of-function* eines Chloridkanals (Cheung and Deber 2008). Analog verursachen Mutationen im *PAH*-Gen einen Funktionsverlust der Phenylalaninhydroxylase (PAH), die sich in der Phenylketonurie (PKU) äußern (Gersting, Kemter et al. 2008).

Insbesondere bei der Pathogenese von angeborenen Stoffwechselerkrankungen spielt der *loss-of-function* Mechanismus eine zunehmend wichtige Rolle und bietet gleichzeitig ein Ziel für innovative pharmakologische Strategien (Muntau, Leandro et al. 2014).

## **1.2 Mevalonatkinase-Defizienz**

### **1.2.1 Hintergrund und klinische Präsentation**

Die Mevalonatkinase-Defizienz (MKD) ist eine seltene angeborene Stoffwechselerkrankung, die sich mit einem autoinflammatorischen Phänotyp präsentiert. Sie gehört zu den inflammatorischen Erkrankungen im Kindesalter. Klinisch führend sind episodisch auftretende Fieberschübe, wobei die Erkrankung von anderen periodischen Fiebersyndromen, wie zum Beispiel dem familiären Mittelmeerfieber oder dem Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrom abzugrenzen ist. Bei der MKD können zwei Phänotypen unterschieden werden: das mildere Hyper-Immunglobulin D-Syndrom (HIDS; *Online mendelian inheritance in man* #260920) (van der Meer, Vossen et al. 1984) und die schwerer verlaufende Mevalonazidurie (MA; *Online mendelian inheritance in man* #610377) (Berger, Smit et al. 1985). Sowohl für das HIDS (Drenth, Cuisset et al. 1999, Houten, Kuis et al. 1999) als auch für die MA (Hoffmann, Gibson et al. 1986) konnten Mutationen im *MVK*-Gen, das die Mevalonatkinase (MVK) kodiert, als krankheitsverursachend identifiziert werden. Dabei werden die beiden Phänotypen als die zwei Extreme eines phänotypischen Kontinuums betrachtet (Simon, Kremer et al. 2004).

Der Altersmedian von MKD-Patienten liegt bei erstmaligem Symptomauftritt bei sechs Monaten. Allerdings findet die Diagnosestellung erst im Alter von im Median 6,5 Jahren statt, was einer Verzögerung von 6 Jahren zwischen Krankheitsbeginn und Diagnose entspricht (Ter Haar, Jeyaratnam et al. 2016). Leitsymptome der MKD stellen im Allgemeinen episodisch auftretende Fieberschübe dar. Die Fieberepisoden können durch Stress, Infektionen oder am häufigsten durch Impfungen hervorgerufen werden und werden

von verschiedenen unspezifischen Symptomen wie Abgeschlagenheit und Spleno- oder Hepatosplenomegalie begleitet. Weitere typische Manifestationen stellen zum einen gastrointestinale Symptome wie Durchfall, Erbrechen und Bauchschmerzen dar. Zum anderen kann es zu Arthralgien, Arthritis, Hautausschlägen, Aphthen und einer Entzündung der Schleimhäute kommen. Seltener treten neurologische Symptome wie Kopfschmerzen oder Gemütsstörungen auf. Die Schübe dauern 3 bis 7 Tage (im Median 4 Tage) und wiederholen sich typischerweise alle 4 Wochen mit im Median 12 Episoden pro Jahr. Die Frequenz schwankt erheblich zwischen den Patienten und nimmt mit zunehmendem Alter ab (van der Hilst, Bodar et al. 2008, Bader-Meunier, Florkin et al. 2011, Ter Haar, Jeyaratnam et al. 2016). Eine wichtige Differentialdiagnose zu den Fieberepisoden stellt das Makrophagenaktivierungssyndrom (MAS) dar, das als Komplikation in 8 Fällen von MKD auftrat. Hierbei kommt es zu einer massiven Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und differenzierter Makrophagen im Zusammenspiel mit einer stark erhöhten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Das MAS stellt einen pädiatrischen Notfall dar und benötigt eine sofortige stationäre Therapie (Rigante, Emmi et al. 2015). Als Spätkomplikation kann in 3 bis 4 % der Fälle eine Amyloidose vom Typ AA beobachtet werden (Obici, Manno et al. 2004, van der Hilst, Bodar et al. 2008, Ter Haar, Jeyaratnam et al. 2016).

MA-Patienten zeigen vergleichbare inflammatorische Symptome. Zusätzlich präsentieren sie sich mit psychomotorischer Retardierung, Entwicklungsverzögerung, fazialer Dysmorphie, zerebellärer Ataxie und muskulärer Hypotonie. Der klinische Verlauf ist oft fulminant und die Erkrankung führt häufig bereits in den ersten Lebensjahren zum Tod (Hoffmann, Charpentier et al. 1993, Haas and Hoffmann 2006).

### **1.2.2 Epidemiologie und Genetik**

Die MKD ist eine sehr seltene Erkrankung, die einem autosomal rezessiven Erbgang folgt. Als krankheitsverursachendes Gen konnte das *MVK*-Gen identifiziert werden (Drenth, Cuisset et al. 1999, Houten, Kuis et al. 1999). Beide Geschlechter sind von der Erkrankung gleich häufig betroffen (van der Hilst, Bodar et al. 2008, Toplak, Frenkel et al. 2012). Gemäß dem Eurofever Projekt (<http://www.printo.it/eurofever>; Toplak et al., 2012) sind mehr als 300 Menschen weltweit erkrankt, von welchen mehr als 80 Fälle aus den Niederlanden stammen. Die populationsgenetische Analyse des *MVK*-Gens in der niederländischen Bevölkerung

konnte eine außerordentlich hohe Trägerfrequenz von 1:153 für die Mutation V377I nachweisen, sowie eine Inzidenz von 6 pro  $10^5$  Neugeborenen (Houten, van Woerden et al. 2003). Es wird vermutet, dass diese lokale Häufung in den Niederlanden durch einen Gründereffekt der Mutation V377I hervorgerufen wurde (Simon, Mariman et al. 2003). In einer dreijährigen prospektiven Studie hat die Inzidenz der MKD in Deutschland 0,39 pro  $10^6$  Personenjahre betragen (Lainka, Neudorf et al. 2012).

Das *MVK*-Gen ist auf dem langen (q) Arm des Chromosom 12 an Position 24 lokalisiert. Gemäß dem Infervers Register (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers/> abgerufen am 18. März 2018) (Sarrauste de Menthier, Terriere et al. 2003, Touitou, Lesage et al. 2004) sind 212 verschiedene Mutationen im *MVK*-Gen bekannt, wovon 132 mit MKD assoziiert sind. Bei den Mutationen handelt es sich hauptsächlich um Basensubstitutionen in Exons, seltener in Introns. Die große Mehrheit der Erkrankten ist *compound* heterozygot, das heißt, sie tragen zwei verschiedene Mutationen auf ihren beiden Allelen (van der Hilst, Bodar et al. 2008). Die häufigsten Mutationen sind V377I und I268T und der Großteil der Patienten trägt mindestens eines dieser beiden Allele. Patienten, die auf mindestens einem Allel die Mutation V377I tragen, präsentieren sich fast ausschließlich mit dem milderen HIDS-Phänotyp. I268T hingegen ist in Abhängigkeit des zweiten Allel sowohl mit MA als auch mit HIDS assoziiert (Houten, Frenkel et al. 2000, Cuisset, Drenth et al. 2001).

Neuere genetische Studien konnten bei weiteren Krankheiten das *MVK*-Gen als potentiell ursächlich identifizieren. So korrelieren *MVK*-Mutationen mit dem Auftreten der Retinitis pigmentosa (Siemiakowska, van den Born et al. 2013), sowie der disseminierten superfiziellen aktinischen Porokeratose (Zhang, Jiang et al. 2012). Jedoch ist der genaue pathophysiologische Mechanismus noch nicht bekannt. Weiterhin wird eine Assoziation von MKD mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) diskutiert. Die Untersuchung des Genoms von sechs MKD-Patienten hat zusätzlich zu den *MVK*-Mutationen weitere genetische Veränderungen vergleichbar mit genetischen Mustern von CED Patienten ergeben (Bianco, Girardelli et al. 2014).

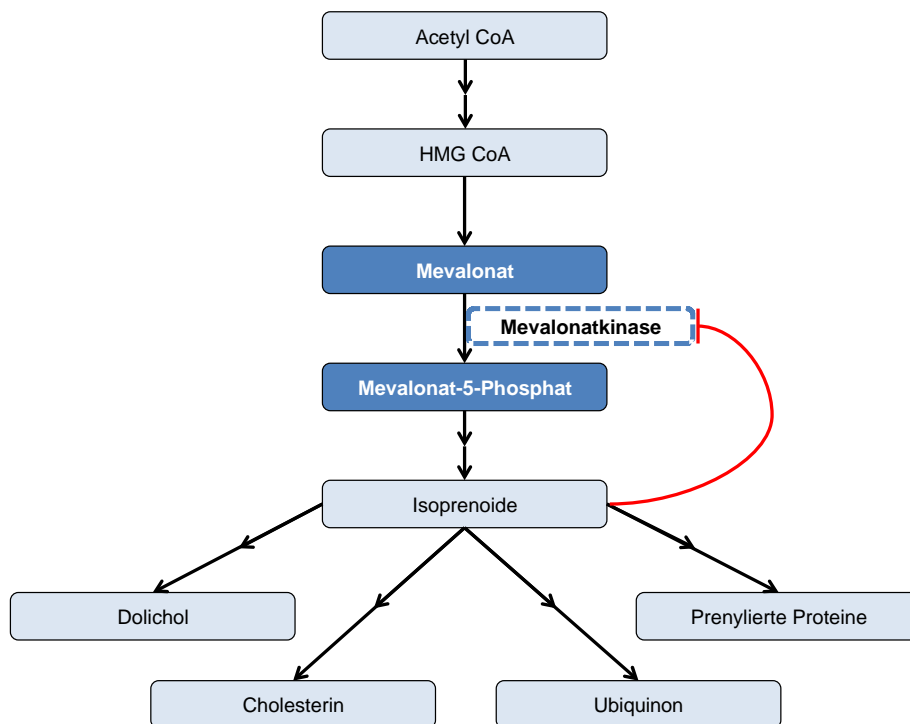
Aufgrund der Korrelation von *MVK*-Mutationen mit deutlich unterschiedlichen Phänotypen wird derzeit der mögliche Einfluss weiterer Mutationen in anderen Genen diskutiert. Allerdings konnten bisher noch keine belastbaren Erkenntnisse gewonnen werden (Marcuzzi, Vozzi et al. 2016). Einzig eine genetische Studie an 22 MKD-Patienten hat ein erhöhtes

Auftreten von Mutationen im *GRID2*-Gen im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt (Moura, Tricarico et al. 2015). Aufgrund der niedrigen Anzahl der untersuchten MKD-Patienten sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um diese Hypothese zu bestätigen.

### **1.2.3 Funktion und Struktur des Mevalonatkinase Proteins**

Die MVK ist am Cholesterin-Metabolismus beteiligt und wird ubiquitär exprimiert. Der Mevalonatstoffwechsel (Abb. 1) ist in den meisten Pilzen, Pflanzen und Eukaryoten notwendig für die Produktion von Isoprenoiden, Ubichinon, Dolichol und dem Sterolgrundgerüst (Bloch 1965). Speziell die Isoprenoide, die der posttranslationalen Proteinmodifikation dienen, haben zuletzt vermehrt Aufmerksamkeit in der onkologischen, neurologischen und immunologischen Forschung erfahren (Resh 2012).

MVK ist im Mevalonatstoffwechsel der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) Reduktase nachgeschaltet und katalysiert die Phosphorylierung von Mevalonat (MVA) zu Mevalonat-5-Phosphat (MVAP). Hierzu benötigt das Enzym das Co-Substrat Adenosintriphosphat (ATP) und Magnesium-Ionen ( $Mg^{2+}$ ) (Tchen 1958). MVK wird von einem Feedbackmechanismus durch später entstehende Stoffwechselprodukte Farnesyl-Pyrophosphat (FPP) und Geranyl-Pyrophosphat (GPP) negativ reguliert. FPP und GPP fungieren als kompetitive Inhibitoren in Bezug auf  $Mg^{2+}$  und ATP und als unkompetitive gegenüber Mevalonat (Goldstein and Brown 1990, Hinson, Chambliss et al. 1997). Weitere Studien konnten zeigen, dass MVAP bei verschiedenen Magnesium-Adenosintriphosphat (MgATP) Konzentrationen einen nicht-kompetitiven und MVA bei MgATP Konzentrationen im Sättigungsbereich einen fast unkompetitiven Inhibitor darstellt. Adenosindiphosphat (ADP) hingegen wirkt als kompetitiver Inhibitor in Bezug auf MVA (Beytia, Dorsey et al. 1970).



**Abbildung 1.** Der Mevalonatstoffwechsel

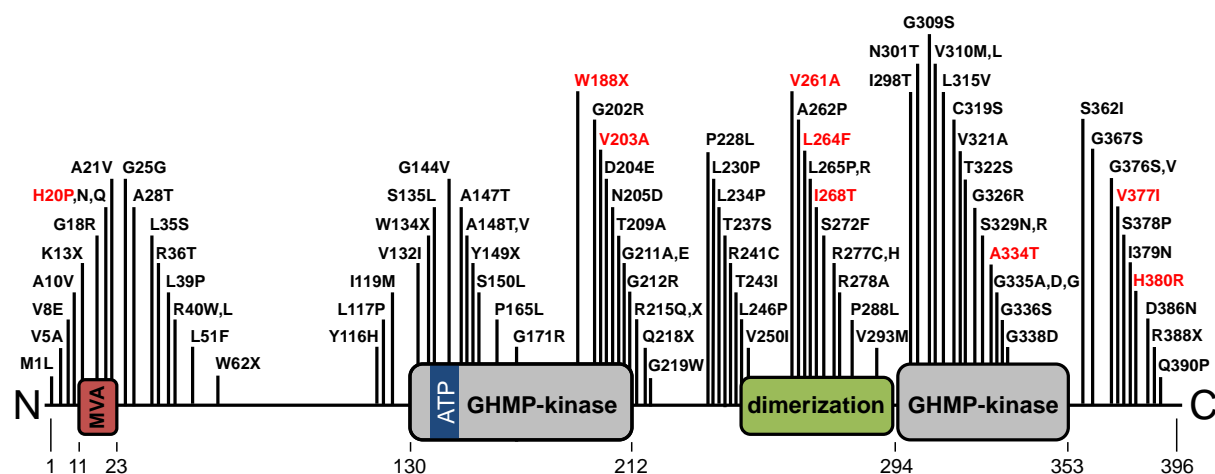
Die Mevalonatkinase stellt ein Schlüsselenzym im Mevalonatstoffwechsel dar, der für die Synthese von Isoprenoiden sowie anderen Metaboliten wie Dolichol, Cholesterin und Ubichinon zuständig ist. Sie katalysiert die Phosphorylierung von Mevalonat und unterliegt einem negativen Feedbackmechanismus durch die Isoprenoide Geranyl- und Farnesyl-Pyrophosphat (nach Reitzle, Maier et al. 2015).

Die Mevalonatkinase zählt zu den Mitgliedern der *galactokinase/ homoserine kinase/ mevalonate kinase/ phosphomevalonate kinase* (GHMP) Familie (Yang, Shipman et al. 2002). In Lösung handelt es sich um ein homodimeres Enzym, dessen Untereinheiten hantelförmig geformt sind und je zwei strukturelle Domänen beinhalten (Fu, Wang et al. 2002). Die N-terminale Domäne besteht aus einem sieben-strängigen  $\beta$ -sheet mit einem anschließenden Bündel aus sieben  $\alpha$ -helices und einem vier-strängigen  $\beta$ -sheet, das einem ähnlichen vier-strängigen  $\beta$ -sheet der C-terminalen Domäne entgegensteht (Abb. 6). Der C-Terminus weist zusätzlich fünf  $\alpha$ -helices auf, wovon zwei die strukturelle Grundlage für die Homodimerisation bilden (Fu, Wang et al. 2002). Die Substratbindestelle von MVA wird im Hohlraum zwischen der Verbindung der zwei Domänen eines Monomers vermutet. Für die Substratbindung ist unter anderem die Seitenkette der Aminosäure A334 notwendig (Hinson, Chambliss et al. 1997). Die Bindung von MgATP erfolgt anti-konformationell und wird von den Aminosäuren E193 und S146 ermöglicht. K13 interagiert hierbei mit der  $\gamma$ -Phosphoryl-Gruppe des ATP und bildet eine Salzbrücke mit D204 aus. D204 wiederum scheint essentiell für die katalytische Funktion zu sein (Potter and Miziorko 1997, Potter,

Wojnar et al. 1997). Interessanterweise nutzen FPP und GPP die gleiche Bindungsstelle wie ATP (K13, S146 und D204), was ihre Funktion als kompetitive Inhibitoren gegenüber MgATP erklären würde. Jedoch konnte gezeigt werden, dass für die effektive Inhibition menschlicher MVK die Polyisoprenoid-Gruppe notwendig ist, da diese die Bindungsstärke erhöht (Fu, Voynova et al. 2008).

## 1.2.4 Auswirkungen von Mutationen auf das Mevalonatkinase Protein

Das Infevers Register (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/> abgerufen am 18. März 2018) enthält 132 Mutationen (Sarrauste de Menthiere, Terriere et al. 2003, Touitou, Lesage et al. 2004), die mit einer MKD assoziiert sind. Beim Großteil handelt es sich um *missense* Mutationen, die zur Substitution einzelner Aminosäuren führen und über das komplette MVK-Gen verteilt sind (Abb. 2). Weiterhin sind auch *frameshift* und *nonsense* Mutationen, die zu trunkierten Proteinen führen, sowie Mutationen in Introns und *splicing sites* beschrieben.



**Abbildung 2.** Non- und missense Mutationen in der Primärsequenz der Mevalonatkinase

Schematische Darstellung des Mevalonatkinase Proteins. Dieses besteht aus 396 Aminosäuren beginnend am N-Terminus (1) bis zum C-Terminus (396). Die funktionellen Domänen sind farblich gekennzeichnet. Bei MVA (rot) und ATP (blau) handelt es sich jeweils um den Proteinabschnitt, der an der Bindung des Substrats Mevalonat bzw. des Kosubstrats ATP beteiligt ist. Die vertikalen Striche markieren die 94 non- und missense Mutationen, die mit der MKD assoziiert sind. Die neun in dieser Studie untersuchten Mutationen sind in rot hervorgehoben.

In allen Fällen der MKD kann eine verminderte Mevalonatkinaseaktivität festgestellt werden. Abhängig vom Schweregrad der Erkrankung ist bei der MA die residuale Aktivität in

Patientenzellen auf  $< 0,5\%$  im Vergleich zu Kontrollen von Gesunden reduziert. Bei HIDS kann eine residuale Aktivität von  $1 - 7\%$  in Leukozyten und/oder Fibroblasten nachgewiesen werden (Houten, Wanders et al. 2000). Weitere Studien haben einen Zusammenhang zwischen dem Funktionsverlust und einer verringerten MVK-Proteinmenge in Fibroblasten von MKD-Patienten nahegelegt. Durch eine Erhöhung oder Erniedrigung der Temperatur kann dieser Effekt *ex vivo* verstärkt beziehungsweise verringert werden (Houten, Frenkel et al. 2002, Mandey, Schneiders et al. 2006). Auch die Zugabe von Glycerin, das die Stabilität von Proteinen erhöht, führt zu einer höheren Restproteinmenge (Mandey, Schneiders et al. 2006). Weiterhin weisen aus *E. coli* aufgereinigte, variante MVK-Proteine eine spezifische Aktivität auf, sodass als Ursache für den Funktionsverlust eine verminderte Proteinstabilität vermutet wird (Houten, Kuis et al. 1999). Jedoch gibt es auch Mutationen, die zu varianten Proteinen führen, für welche weder eine spezifische Aktivität *in vitro* noch eine residuale Aktivität in Zellen gemessen werden kann (Mandey, Schneiders et al. 2006). Für diese Varianten ist kein Patient mit einem homozygoten Genotyp bekannt und der zugehörige Phänotyp möglicherweise nicht mit dem Leben vereinbar.

### **1.2.5 Konsequenzen für den zellulären Metabolismus**

Bei der MKD ist die Funktion der Mevalonatkinase gestört, wobei das Maß der Aktivitätsreduktion mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (Houten, Wanders et al. 2000). Aufgrund des Funktionsverlusts kommt es zu einer Akkumulation des Substrats MVA, deren Ausprägung von der Restaktivität abhängig ist. Folglich kann die Exkretion von MVA im Urin bei MA konstant nachgewiesen werden (Hoffmann, Charpentier et al. 1993), wohingegen diese bei HIDS nur während der Fieberepisoden messbar ist (Houten, Kuis et al. 1999). Weiterhin führt die Einschränkung der Enzymfunktion auch zu einem Mangel an Produkten des Mevalonatstoffwechsels (Abb. 1). Allerdings sind nicht alle Metabolite des Stoffwechselweges gleichermaßen betroffen.

So zeigen MKD-Patienten normale Cholesterinwerte im Serum und in der *post mortem* Analyse einer Leber eines MKD-Patienten wurden keine erniedrigten Werte an Cholesterin, Squalen und Dolichol festgestellt (Hoffmann, Charpentier et al. 1993). Bei Patienten mit MA zeigen sich erniedrigte Ubichinon-10 Plasmaspiegel und es wird vermutet, dass dies zu einer vermehrten Lipidperoxidation führt. Infolgedessen kommt es zu einer Atrophie des



Cerebellums, da dies eine vulnerable Gehirnregion hierfür darstellt. Weiterhin treten bei einem Mangel an Ubichinon-10 vermehrt Myopathien und Katarakt auf (Hübner, Hoffmann et al. 1993).

Erste Hinweise auf die Relevanz eines Mangels an Isoprenoiden für die Pathophysiologie lieferte eine Studie, in welcher MKD-Patienten mit Statinen (HMG-CoA Reduktase-inhibitoren) zur Reduktion der MVA-Akkumulation behandelt wurden. Die Inhibition der HMG-CoA Reduktase führt entgegen der Erwartung zu einer Exazerbation der Erkrankung (Hoffmann, Charpentier et al. 1993).

### **1.2.6 Autoinflammation und die Bedeutung von Interleukin-1 $\beta$**

Ein Hauptmerkmal der MKD stellen die wiederkehrenden Fieberepisoden dar. Diese werden von verschiedenen Akute-Phase-Proteinen und Zytokinen, zum Beispiel Interferon- $\gamma$  und Interleukin-6 (IL-6), vermittelt. Weiterhin haben *ex vivo* Studien an mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von MKD-Patienten, die sich zu diesem Zeitpunkt in einer Fieberepisode befanden, eine erhöhte Produktion von Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) auf Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) gezeigt (Drenth, van Deuren et al. 1995). Dies legt eine Voraktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems nahe. In weiteren Untersuchungen zeigten auch PBMC von MKD-Patienten ohne aktuelle Symptome auf die Stimulation mit LPS eine deutlich höhere Sekretion von Zytokinen (u.a. IL-1 $\beta$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Effekt kann durch die gleichzeitige Inkubation der PBMC mit dem Substrat Mevalonat, sowie den Isoprenoiden Farnesol (FOH) oder Gernylgeraniol (GGOH) reduziert werden. Die Behandlung der Zellen mit Lovastatin, einem HMG-CoA Reduktaseinhibitor, der die Menge an verfügbarem Mevalonat in der Zelle reduziert, hingegen verstärkt die IL-1 $\beta$  Sekretion (Frenkel, Rijkers et al. 2002, Mandey, Kuijk et al. 2006). Diese Beobachtung konnte in einem Mausmodell für MKD bestätigt werden (Marcuzzi, Crovella et al. 2011).

Da IL-1 $\beta$  ein starker Stimulus einer Akute-Phase-Reaktion ist, könnte es maßgeblich zur Entstehung der Fieberepisoden bei MKD beitragen. IL-1 $\beta$  wird hauptsächlich von Makrophagen und mononukleären Zellen des angeborenen Immunsystems nach der Aktivierung des Inflammasoms produziert (Latz, Xiao et al. 2013). Die Inflammasom-

aktivierung führt ihrerseits zur Aktivierung von Caspase-1, die die Spaltung von pro-IL-1 $\beta$  zum aktiven IL-1 $\beta$  katalysiert (Schroder and Tschopp 2010). Es konnte gezeigt werden, dass GGOH die Aktivierung von Caspase-1 negativ reguliert und umgekehrt der Mangel an GGOH die Aktivierung verstärkt (Montero, Matilla et al. 2004). Der Mechanismus hierfür liegt in der posttranslationalen Proteinmodifikation mit GPP (Geranylierung), das aus GGOH gebildet wird. Ein Mausmodell mit defizienter Geranylierung zeigte einen inflammatorischen Phänotyp ähnlich dem MKD-Mausmodell, das eine erhöhte Produktion proinflammatorischer Zytokine (u.a. IL-1 $\beta$ ) aufweist (Marcuzzi, Pontillo et al. 2008).

In Fibroblasten von MKD-Patienten konnte gezeigt werden, dass aufgrund einer gestörten Lokalisation die Funktion von RhoA und Rac1, beides Mitglieder der Ras Proteinfamilie und Teil der Familie der *small guanosine triphosphatases* (GTPasen), beeinträchtigt ist (Henneman, Schneiders et al. 2010). RhoA benötigt für seine biologische Funktion an der Membran eine Geranylierung, sodass ein Mangel an Isoprenoiden hervorgerufen von der MKD oder eine Behandlung mit Statinen zu einer verminderten Funktion und in der Folge zur erhöhten Zytokinproduktion führt (Frenkel, Rijkers et al. 2002, Park, Wood et al. 2016). Als entscheidendes Protein dieses Signalwegs konnte das Pyrin-Inflammasom identifiziert werden. So führen unprenylierte Ras-Proteine unter Mitwirkung des PI3K-Proteins zu einer TLR-vermittelten unkontrollierten Aktivierung des Pyrin-Inflammasoms (Abb. 3), das seinerseits die Caspase-1 vermittelte Zytokinproduktion und -sekretion steigert (Akula, Shi et al. 2016). Die Aktivität des Pyrin-Inflammasoms korreliert hierbei invers mit der Aktivität von RhoA, das im prenylierten Zustand Pyrin inhibiert (Abb. 3) (Park, Wood et al. 2016). Weiterhin führt der *knock-down* von *Mefv*, das das Pyrin-Inflammasom kodiert, zu einem deutlichen Rückgang der Zytokinproduktion (Akula, Shi et al. 2016). Auch weitere Proteine der Ras-Familie sind durch die beeinträchtigte Prenylierung in ihrer Funktion gestört. So finden sich in PBMC von MKD-Patienten vermehrt unprenylierte Proteine der Rab-Familie, die jedoch nicht zu einer erhöhten Zytokinfreisetzung beitragen (Jurczyluk, Munoz et al. 2016). Allerdings können diese als Biomarker für die Diagnose der MKD in Abgrenzung von anderen autoinflammatorischen Fiebersyndromen genutzt werden (Munoz, Jurczyluk et al. 2017).



### 1.2.7 Diagnostik und Therapie

Das Auftreten von wiederkehrenden Fieberschüben ohne Infektionsfokus über einen Zeitraum von sechs Monaten ist charakteristisch für alle autoinflammatorischen Fiebersyndrome und bedarf einer pädiatrischen Abklärung. Eine MKD sollte in Betracht gezogen werden wenn das Immunglobulin D im Serum erhöht ist, ein Geschwisterkind an MKD leidet, die erste Fieberepisode nach einer Impfung auftrat oder drei der folgenden Symptome die Fieberepisode begleiten: zervikale Lymphadenopathie, abdominelle Schmerzen, Erbrechen oder Durchfall, Arthralgie oder Arthritis von großen peripheren Gelenken, Aphthen und Hautausschläge (van der Hilst, Bodar et al. 2008).

**Tabelle 1.** Diagnosekriterien der Mevalonatkinase-Defizienz (nach Federici, Sormani et al. 2015)

Symptome	Score
<b><i>Vorhandensein</i></b>	
Manifestationsalter < 2 Jahre	10
Aphthöse Stomatitis	11
Allgemeine Lymphadenopathie oder Splenomegalie	8
Schmerzhafte Lymphknoten	13
Diarrhoe (gelegentlich/oft)	20
Diarrhoe (immer)	37
<b><i>Abwesenheit</i></b>	
Brustschmerz	11
<b>MKD Diagnose Schwellenwert</b>	<b>≥ 42</b>

Zuletzt hat das Eurofever Register evidenzbasierte klinische Diagnosekriterien für MKD (Tabelle 1) und andere hereditäre Fiebersyndrome publiziert. Der Score zeigte eine Sensitivität von 93 % und eine Spezifität von 89 % (Federici, Sormani et al. 2015). Jedoch bemerken die Autoren, dass die Diagnosekriterien möglicherweise nicht auf die MA, den schwereren Phänotyp der MKD, anzuwenden sind. Neben den klinischen Symptomen lassen sich während der Fieberepisoden erhöhte Entzündungsmarker, wie C-reaktives Protein (CRP), Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und Serum Amyloid A (SAA) im Blut messen. Zusätzlich lässt sich die Exkretion von MVA im Urin messen, welche bei HIDS-Patienten während des Fiebers auftritt (Houten, Kuis et al. 1999) und bei MA konstant nachweisbar ist

(Hoffmann, Charpentier et al. 1993). Die diagnostische Bedeutung der MVA-Exkretion wurde anhand einer Kohorte von 61 Patienten mit dem klinischen Verdacht auf MKD überprüft. Es ergab sich eine Sensitivität von 92 % und eine Spezifität von 90 % mit einem negativen prädiktiven Wert von 98 %, sodass eine MKD bei normaler MVA-Exkretion mit relativer Sicherheit ausgeschlossen werden kann (Jeyaratnam, Ter Haar et al. 2016). Im Gegensatz hierzu zeigten erhöhte Immunglobulin D-Werte eine Sensitivität von 79 % und eine Spezifität von 27 % und haben kaum diagnostische Relevanz (Ammouri, Cuisset et al. 2007). Bei einem Verdacht auf eine vorliegende MKD wird die Diagnose entweder durch das Vorliegen von Mutationen auf den zwei *MVK*-Allelen oder durch die deutlich Verminderung der residualen *MVK*-Aktivität in Patientenzellen bestätigt. Weiterhin legen neuere Studien den Nachweis von unprenyliertem Rab-Protein als Biomarker zur Abgrenzung der MKD von anderen autoinflammatorischen Fiebersyndromen nahe (Munoz, Jurczyk et al. 2017).

Bei der MKD korreliert die residuale Aktivität in Patientenzellen mit der Schwere der Erkrankung (Houten, Wanders et al. 2000). Die Korrelation ist jedoch limitiert (Bader-Meunier, Florkin et al. 2011), was möglicherweise an den sehr geringen residualen Aktivitäten liegt, die einen präzisen Aktivitätsassay zur genauen Quantifizierung benötigen. Derzeit wird die Enzymaktivität der *MVK* mittels eines radioaktiven Assays bestimmt, der die Produktion von MVAP und Mevalonat-Pyrophosphat aus radioaktivem MVA ermittelt (Hoffmann, Brendel et al. 1992).

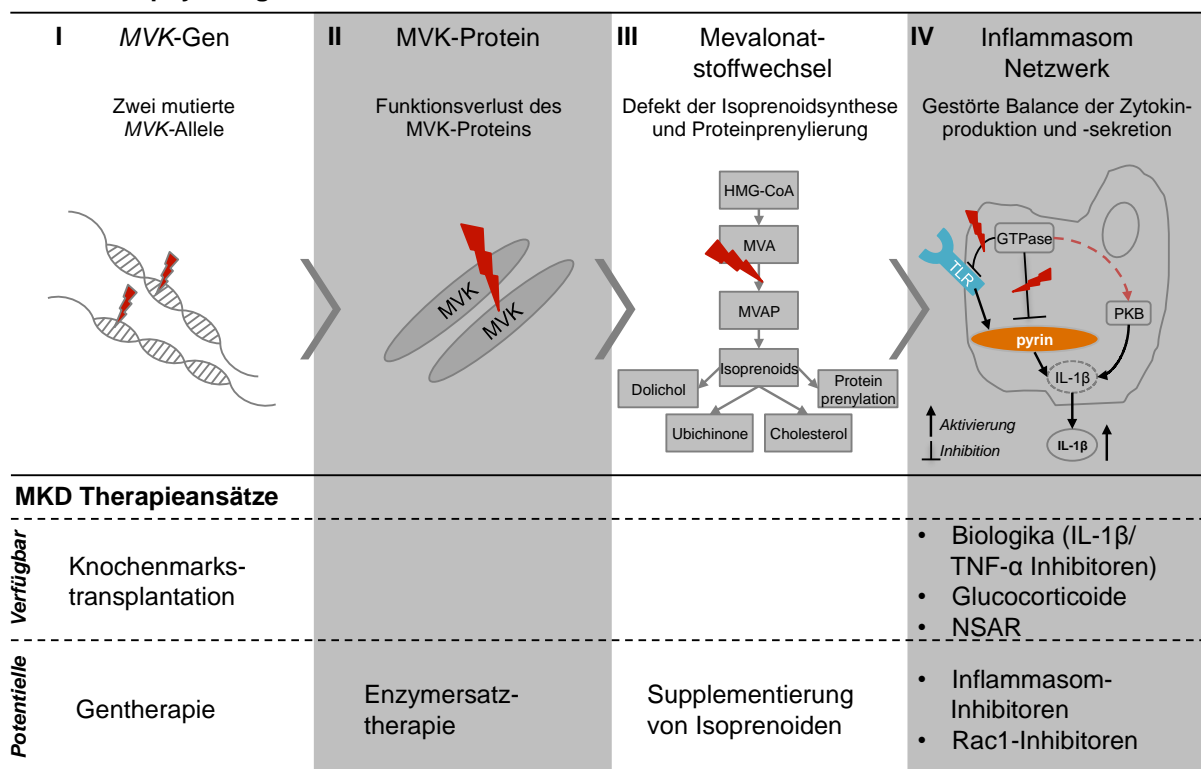
Das Therapieziel bei der MKD ist die Symptomkontrolle der inflammatorischen Symptome, da eine Heilung derzeit nicht möglich ist. Weitere Ziele sind die Kontrolle von unerwünschten Nebenwirkungen von Medikamenten, die Prävention von Spätkomplikationen und die Verbesserung der Lebensqualität.

Gemäß der Empfehlung von Ter Haar et al. wird bei Kontrolluntersuchungen die Krankheitsaktivität anhand der körperlichen Untersuchung und der Bestimmung der Entzündungsparameter (CRP, SAA) überprüft (Ter Haar, Oswald et al. 2015). Weiterhin erfolgt die Untersuchung der geistigen und körperlichen Entwicklung. Der Urin sollte regelmäßig auf Protein- und Hämaturie überprüft werden, um eine Glomerulonephritis frühzeitig zu erkennen. Zusätzlich sind regelmäßige Augenuntersuchungen zum Ausschluss einer Retinitis pigmentosa sowie eines Katarakts angeraten. Bei schwererer Krankheitsausprägung sollte auch eine intensive kognitive und neurologische Untersuchung erfolgen

(Ter Haar, Oswald et al. 2015). Da in einer weiteren Studie die deutliche Einschränkung der Lebensqualität von MKD-Patienten gezeigt wurde, ist auch die Beurteilung des Wohlbefindens und der sozialen Teilhabe Bestandteil des Therapiemanagements (van der Hilst, Bodar et al. 2008).

Bei den Kontrolluntersuchungen sollte auch auf Hinweise für schwere Langzeitkomplikationen geachtet werden. Obwohl die Amyloidose eine sehr seltene Komplikation darstellt, sollte auf eine suffiziente antiinflammatorische Therapie geachtet werden, da diese das Risiko eines Auftretens verringert (Obici, Manno et al. 2004). Weiterhin müssen Fieberepisoden von einem Makrophagenaktivierungssyndrom abgegrenzt werden, welches durch hohes Fieber, Panzytopenie und erhöhte Leberenzyme gekennzeichnet ist (Minoia, Davi et al. 2014).

#### MKD Pathophysiologie



**Abbildung 4.** Pathophysiologie der Mevalonatkinase-Defizienz und Therapieansätze

Ursächlich für die MKD sind Mutationen auf beiden Allelen des *MVK*-Gens (I), das für das Mevalonatkinase Protein kodiert. Die Mutationen führen zum Funktionsverlust des MVK-Proteins (II), woraus eine Störung des Mevalonastoffwechsels resultiert (III). Der Mangel an Isoprenoiden führt zu einer Beeinträchtigung des Inflammasom-Netzwerks und schlussendlich zu einer erhöhten Zytokinproduktion (IV). Die derzeit verfügbaren Therapieansätze konzentrieren sich auf die Inhibition der Autoinflammation und der Zytokinproduktion.

Obwohl Fieberepisoden durch Impfungen ausgelöst werden können, stellt die MKD keine Kontraindikation für Impfungen dar. Einzige Ausnahme bildet hierbei die Gabe von Lebendimpfungen bei gleichzeitiger Behandlung mit Biologika, wie zum Beispiel Etanercept (Ter Haar, Oswald et al. 2015).

Da keine krankheitsspezifische Therapie verfügbar ist, konzentriert sich die medikamentöse Therapie auf die Kontrolle der Inflammation. Für die Behandlung einer Fieberepisode werden Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) und Glucocorticoide empfohlen (Abb. 4). Diese konnten in einer retrospektiven Studie die Intensität der Fieberepisode verringern, nicht jedoch die Länge (Ter Haar, Oswald et al. 2015). Die Gabe von Statinen erwies sich als nicht effektiv und löste bei MA-Patienten Fieberepisoden aus (Bader-Meunier, Florkin et al. 2011). Spezifischere Therapeutika für die Hemmung der Inflammation stellen die sogenannten Biologika dar. Die Blockade von IL-1 $\beta$  durch Anakinra zu Beginn einer Fieberepisode, erwies sich in einer kleinen prospektiven Studie als effektiv und konnte die Dauer der Fieberepisode deutlich verkürzen (Bodar, Kuijk et al. 2011). Im Falle einer hohen Frequenz des Auftretens von Fieberepisoden oder dauerhafter subklinischer Inflammation ist eine kontinuierliche Therapie mit Biologika, die entweder IL-1 $\beta$  (Anakinra, Canakinumab) oder TNF- $\alpha$  (Etanercept, Adalimumab) blockieren, empfohlen. Von dieser Therapie profitieren zwei Drittel der Patienten. Jedoch erlauben die bisherigen Daten keine Aussage darüber, welches Medikament bevorzugt als Erstlinientherapie verabreicht werden soll (Ter Haar, Oswald et al. 2015). Eine neuere Phase II Studie zu Canakinumab an 9 MKD-Patienten zeigte eine hohe Effektivität und reduzierte das Auftreten von Fieberepisoden signifikant (Arostegui, Anton et al. 2017). Allerdings zeigt die Behandlung mit Biologika auch unerwünschte Arzneimittelwirkungen. Hierbei steht ein erhöhtes Infektionsrisiko durch den Eingriff der Biologika in die Immunantwort auf Pathogene, wie Bakterien und Viren, im Vordergrund. Zahlreiche Studien dokumentieren das gehäufte Auftreten von Infektionen unter der Therapie mit Biologika, wobei diese nur in seltenen Fällen einen schweren Verlauf aufweisen (Bodar, Kuijk et al. 2011, Rossi-Semerano, Fautrel et al. 2015, Arostegui, Anton et al. 2017).

In zwei Fällen von sehr schwer betroffenen MKD-Patienten, deren Symptome sich nicht auf die medikamentöse Therapie besserten, hat sich eine Stammzelltransplantation als erfolgreich erwiesen und konnte die neurologischen und inflammatorischen Symptome deutlich verbessern (Arkwright, Abinun et al. 2007, Neven, Valayannopoulos et al. 2007). Aufgrund

der Invasivität des Eingriffs sollte die Indikation jedoch sorgfältig abgewogen werden. Unabhängig davon sollten Patienten bei bestehendem Verdacht und bei bestätigter MKD in spezialisierten Zentren behandelt und die Krankheitsaktivität regelmäßig überwacht werden.



## 2 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der molekularen Mechanismen, über die Mutationen im *MVK*-Gen zum Funktionsverlust des Mevalonatkinase Proteins führen. Voruntersuchungen hatten indirekte Hinweise dafür ergeben, dass es sich bei der Mevalonatkinase-Defizienz um eine Proteinfaltungserkrankung mit *loss-of-function* handeln könnte. Diese Hypothese sollte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit geprüft werden.

Es wurden die neun häufigsten *missense* und *nonsense* Mutationen im *MVK*-Gen ausgewählt und folgende experimentelle Teilziele verfolgt.

- (I) Rekombinante Expression und Reinigung der korrespondierenden varianten *MVK*-Proteine und anschließende Untersuchung der nativen Struktur der varianten Proteine mittels *size exclusion chromatography* und *blue native page polyacrylamide gel electrophoresis* (Oligomerisierung und Aggregation);
- (II) Analyse der thermischen Stabilität mittels *differential scanning fluorimetry* und der temperaturabhängigen Aggregation mittels *right angle light scattering* sowie Berechnung thermokinetischer Parameter;
- (III) Entwicklung und Anwendung eines neuartigen *MVK*-Enzymaktivitätsassays mittels *isotope dilution* Tandem-Massenspektrometrie und Bestimmung der spezifischen *MVK*-Enzymaktivität am gereinigten Protein;
- (IV) Korrelation der am rekombinaten *MVK*-Protein gewonnen Daten mit biochemischen (residuale *MVK*-Aktivität) und klinischen Patientendaten (Literatur und eigenes Kollektiv).

## 3 Material

### 3.1 Plasmide und Vektoren

Plasmid	Hersteller
pENTR223.1	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
pMAL-c2X	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)

### 3.2 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Hersteller
<i>E. coli</i> DH5α	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
XL1-Blue Supercompetent Cells	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Waldbronn)

### 3.3 Reagenziensätze (Kits)

Reagenziensatz	Hersteller
Bradford Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Plasmid Miniprep Kit I, peqGOLD	VWR International GmbH (Darmstadt)
QuikChange site-directed mutagenesis kit	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Waldbronn)

### 3.4 Chemikalien

#### 3.4.1 Allgemeine Chemikalien

Produktname	Hersteller
Acetonitril	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)
Essigsäure 100 % zur Analyse	Applichem (Darmstadt)
Ethanol	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)
HEPES Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

Methanol	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)
Natriumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck KGaA (Darmstadt)
Salzsäure (1 N), HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Tris-HCl	AppliChem GmbH (Darmstadt)

### 3.4.2 Klonierung und Proteinproduktion

Produktname	Hersteller
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
D-Maltose	Serva (Heidelberg)
Ethidiumbromid 0,625 g/ml	Olerup SSP AB (Stockholm, Schweden)
Factor Xa, Restriction Grade, Bovine Plasma	Merck KGaA (Darmstadt)
FastDigest Green Buffer (10X)	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
FastDigest Sall	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
Gateway® BP Clonase® Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
Gel Loading Solution (6x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Glucose solution 5 %	Braun (Melsungen)
Isopropyl-thio-b-D-galactosid	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Proteinase K Lösung (20 mg/ml), RNA grade	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
Spectinomycin-2-HCl-pentahydrate	Serva (Heidelberg)
Pepton	Oxoid (Wesel)
Hefeextrakt	Oxoid (Wesel)

### 3.4.3 BN-PAGE und Western Blot

Produktname	Hersteller
Anti-MBP Antiserum	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
Donkey anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
Milchpulver, Blotting-Grade, pulv., fettarm	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
MVK Antikörper (A-20)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
NativeMark™ Unstained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
NativePAGE™ 20X Cathode Buffer Additive	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
NativePAGE™ Running Buffer (20x)	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
NativePAGE™ Sample Buffer (4X)	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
NuPAGE® Transfer Buffer (20X)	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
Tween® 20 für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH (Darmstadt)

### 3.4.4 DSF, RALS und Unfolding kinetics

Produktname	Hersteller
8-Anilino-1-Naphtalenesulfonsäure	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
SYPRO® Orange Protein Gel Stain	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)

### 3.4.5 Enzymaktivitätsassay

Produktname	Hersteller
[ <sup>13</sup> C, <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-DL-Mevalonat-5-Phosphat	AlsaChim (Illkirch, Frankreich)
Adenosin-5'-Triphosphat Disodiumhydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Butanol-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA (Darmstadt)
R-Mevalonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
R-Mevalonat-5-Phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Tris-HCl	AppliChem GmbH (Darmstadt)

## 3.5 Puffer und Lösungen

### 3.5.1 Klonierung und Proteinproduktion

Puffer	Bestandteile
LB-Medium	Hefeextrakt 0,5 %, Pepton 1 %, NaCl 1 %, pH=7,4
LB-Agar	LB-Medium, Agar 2 %
TBE-Puffer	90 mM Tris-HCl, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH=8,0
Säulenpuffer	10 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, pH 7,4
HEPES-Puffer	20 mM HEPES, 0,2 M NaCl, pH 7,0

### 3.5.2 BN-PAGE und Western Blot

Puffer	Bestandteile
Coomassie-Lösung	0,2 % Coomassie, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure
<i>Destaining</i> -Lösung	25 % Methanol, 10 % Essigsäure
TBS-Puffer	10 mM Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 100 mM Glycin, 1 mM EDTA, 0,1 % Tween 20, pH 7,5
<i>Blocking</i> -Lösung	5 % Milchpulver in TBS-Puffer
Fixierlösung	40 % Methanol, 10 % Essigsäure

### 3.5.3 Enzymaktivitätsassay

Puffer	Bestandteile
Aktivitätspuffer	100 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl <sub>2</sub> , 4 mM ATP, pH 7,0

### 3.6 Verbrauchsmittel

Produktname	Hersteller
10 mL BD™ slip-tip syringe, bulk, non-sterile	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
20 mL BD™ slip-tip syringe, bulk, non-sterile	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Corning® 50mL PP Centrifuge Tubes	Corning GmbH (Wiesbaden)
CryoPure Tube 1.8ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Eppendorf PCR Tubes, 0.2 mL	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorf PCR-Gefäße, 0.5 mL, PCR clea	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2.0 mL	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorf Tubes® 3810X, 1.5 mL	Eppendorf AG (Hamburg)
Filtropur S 0.45	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Mikrotestplatte 96 Well, F	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
NativePAGE™ Novex™ 4-16 % Bis-Tris Protein Gels	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
Amersham Hybond P 0.45 PVDF	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
NuPAGE™ Novex™ 10 % Bis-Tris Protein Gel	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
Petrischale 92x16 mm ohne Nock.	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Pipettenspitze 1000 µl, blau	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Pipettenspitze 10 µl, farblos	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Pipettenspitze 200 µl, gelb	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Serologische Pipette 2 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)

### 3.7 Geräte

Gerätename	Hersteller
ACQUITY UPLC HSS T3 Column	Waters GmbH (Eschborn)
ÄKTApurifier 10	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
Avanti <sup>®</sup> J-E	Beckman Coulter GmbH (Krefeld)
Centrifuge 5415 d	Eppendorf AG (Hamburg)
Centrifuge 5417 r	Eppendorf AG (Hamburg)
Desintegratoren, Sonifier <sup>®</sup> , Branson	VWR International GmbH (Darmstadt)
Diana III	raytest Isotopenmessgeräte GmbH (Staubenhardt)
Eppendorf Easypet <sup>®</sup>	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorf Research <sup>®</sup> plus, Einkanal, variabel, 0.1 – 2.5 µL, dunkelgrau	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorf Research <sup>®</sup> plus, Einkanal, variabel, 2 – 20 µL, blau	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorf Research <sup>®</sup> plus, Einkanal, variabel, 20 – 200 µL, gelb	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorf Research <sup>®</sup> plus, Einkanal, variabel, 100 – 1000 µL, blau	Eppendorf AG (Hamburg)
FLUOstar Omega	BMG Labtech GmbH (Ortenberg)
Fraction Collector Frac-950	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
Heraeus B6 Function Line, Brutschrank	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
HiLoad 16/60 Superdex 200 PG	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
Mastercycler personal	Eppendorf AG (Hamburg)
MBPTrap HP, 1 x 5 ml	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
Milli-Q <sup>®</sup> Integral 5	Merck KGaA (Darmstadt)
Netzgeräte, Serie EV2xx	VWR International GmbH (Darmstadt)
New Brunswick <sup>™</sup> Excella <sup>®</sup> E24	Eppendorf AG (Hamburg)
Reagenzglasschüttler, Vortex-Genie <sup>®</sup>	VWR International GmbH (Darmstadt)
Rotanta 460 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen)
Thermomixer 5436	Eppendorf AG (Hamburg)
Ultrospec 3100 pro	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
XCell4 SureLock <sup>™</sup> Midi-Cell	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
Xevo TQ-S	Waters GmbH (Eschborn)

### 3.8 Software

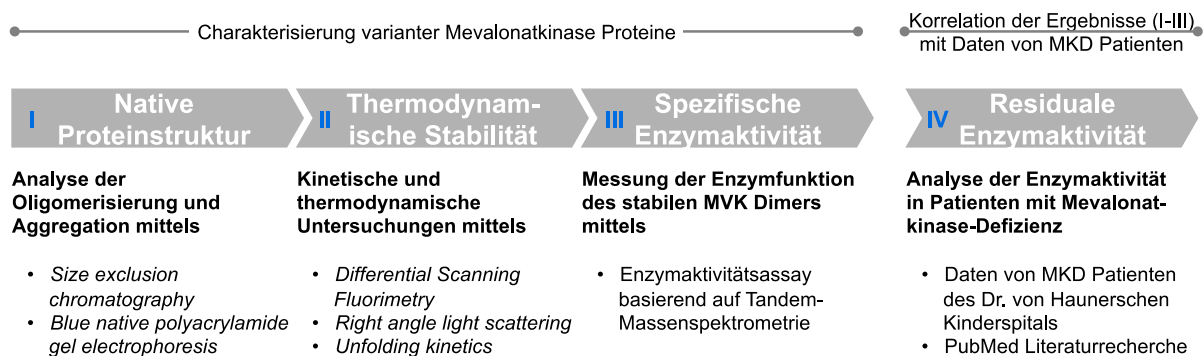
Software	Hersteller
AIDA Image Analyzer	raytest Isotopenmessgeräte GmbH (Staubenhardt)
EndNote X7	Bilaney Consultants GmbH (Düsseldorf)
ImageJ 1.45s	Wayne Rasband (National Institute of Health, USA)
Office 2011 for Mac	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Prism 5.0a for Mac	GraphPad Software (San Diego, USA)
PyMol - The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8	Schrödinger, LLC (New York, USA)
QuikChange Primer Design	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Waldbronn)
TargetLynx	Waters GmbH (Eschborn)



## 4 Methoden

### 4.1 Übersicht über die verwendeten Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von neun Mutationen im *MVK*-Gen auf die korrespondierenden varianten *MVK*-Proteine untersucht (Tabelle 2). Es erfolgte die strukturelle und funktionelle Charakterisierung der varianten Proteine. Anschließend wurden die Ergebnisse mit den klinischen Daten sowie der residualen Enzymaktivität in Zellen von MKD-Patienten verglichen (Abb. 5).



**Abbildung 5.** Übersicht über die verwendeten Methoden

Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Methoden zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung der varianten Mevalonatkinase Proteine (I-III). Daraufaufgehend wurden die Mevalonatkinaseaktivität in Zellen von MKD-Patienten untersucht (IV) und mit den Daten der Experimente I-III verglichen.

Vorbereitend zur funktionellen und strukturellen Charakterisierung der neun *MVK*-Varianten erfolgte die Einführung der neun Mutationen in die *MVK*-cDNA, sowie die anschließende Klonierung in einen prokaryoten Expressionsvektor zur Proteinproduktion in *E. coli*. Nach der Proteinproduktion wurde die native Proteinstruktur mittels *size-exclusion chromatography* (SEC) sowie *blue native polyacrylamide gel electrophoresis* (BN-PAGE) analysiert (I). Hierbei wurden die Oligomerisierung und die Aggregation der *MVK*-Varianten im Vergleich zum Wildtyp untersucht und quantifiziert. Im zweiten Schritt wurde die thermodynamische und kinetische Proteininstabilität der Varianten analysiert (II). Mittels *differential scanning fluorimetry* (DSF) wurde die Proteinentfaltung und mittels *right angle light scattering* (RALS) das Aggregationsverhalten in Abhängigkeit der Temperatur bestimmt. Anschließend wurde die Aktivierungsenergie, die zur Entfaltung benötigt wird experimentell bestimmt (*unfolding kinetics*). Zur funktionellen Untersuchung der varianten

Proteine wurde ein Enzymaktivitätsassay basierend auf der Quantifizierung von Mevalonat-5-Phosphat mittels *isotope dilution* Tandem-Massenspektrometrie entwickelt und die spezifische Aktivität der dimeren MVK-Varianten gemessen (III). Zuletzt erfolgte die Analyse der residualen MVK-Aktivität in Zellen von MKD-Patienten und der Vergleich mit der spezifischen Enzymaktivität, die im vorausgegangenen Experiment bestimmt wurde (IV).

#### 4.1.1 Klonierung und Einführung der Mutationen in das *MVK*-Gen

Im ersten Schritt wurden ausgehend von der *MVK*-Wildtyp cDNA neun Plasmide erstellt, die die verschiedenen Mutationen (Tabelle 2) beinhalten. Das Plasmid mit der cDNA des *MVK*-Wildtyps (NM\_000431.3) wurde von der *Mammalian Gene Collection* erworben. Als Vektor diente hierbei der pENTR223.1. Die neun Mutationen wurden mittels *site-directed mutagenesis* eingeführt. Zuletzt wurde die cDNA des *MVK*-Wildtyps und der neun Varianten in den Vektor pMAL-c2X kloniert, der der Expression in prokaryoten Zellen dient. Dieser Vektor kodiert zusätzlich zur jeweiligen *MVK*-cDNA auch einen N-terminalen *maltose-binding protein* (MBP)-tag, der mittels einer Faktor Xa-Schnittstelle mit dem restlichen Protein verbunden ist.

**Tabelle 2.** Übersicht über die untersuchten *MVK*-Mutationen

cDNA	Protein	Trivialname
c.59A>C	p.His20Pro	H20P
c.564G>A	p.Trp188*	W188X
c.608T>C	p.Val203Ala	V203A
c.782T>C	p.Val261Ala	V261A
c.790C>T	p.Leu264Phe	L264F
c.803T>C	p.Ile268Thr	I268T
c.1000G>A	p.Ala334Thr	A334T
c.1129G>A	p.Val377Ile	V377I
c.1139A>G	p.His380Arg	H380R

#### 4.1.2 Anzucht von *Escherichia coli* und Anlage von Dauerkulturen

Die Anzucht der verschiedenen *E. coli* Stämme erfolgte bei 37 °C über Nacht auf einem Schüttler bei 200 U/min. Je nach Anwendung wuchsen die Bakterien in 15 ml Falcon-Tubes, in Erlenmeyerkolben oder auf selektiven Agarplatten. Hierbei wurden bei Bedarf folgende Antibiotika in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt (Tabelle 3).

**Tabelle 3.** Übersicht über die verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration	Plasmid
Spectinomycin	100 µg/ml	pENTR223.1
Ampicillin	50 µg/ml	pMal-c2X

Zur Ernte der *E. coli* Bakterien wurden die Proben für 10 Minuten bei 4.600 U/min und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die langfristige Lagerung wurden Glycerinstocks angelegt, wozu 500 µl der Bakteriensuspension mit 500 µl 85 %igem Glycerol gemischt wurden und anschließend bei -80 °C aufbewahrt wurden.

#### 4.1.3 Site-directed mutagenesis

Die Einführung der neun Mutationen in das *MVK*-Gen erfolgten gemäß dem Protokoll des auf PCR basierenden *QuikChange site-directed mutagenesis kit*, das Modifikationen an superspiralisierter Doppelstrang-DNA (dsDNA) erlaubt. Im ersten Schritt wurden mit Hilfe des Programms *QuikChange Primer Design* je ein *forward* und *reverse* Primer erstellt, der den gewünschten Basenaustausch für den *sense* beziehungsweise den komplementären *antisense* Strang kodiert (Tabelle 4). Im zweiten Schritt erfolgte die Verlängerung der Oligonukleotid-Primer mittels Polymerase, der zur Bildung von einzelsträngigen Plasmid-Kopien mit der gewünschten Mutation führt. Gemäß dem Protokoll wurden 50 ng des dsDNA Templates (*MVK*-Plasmid), je 125 ng des *forward* und *reverse* Primer, sowie 1 µl des dNTP Mix und 5 µl des 10x Reaktionspuffer mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl verdünnt. Zum Start der Reaktion erfolgte die Zugabe von 1 µl *PfuUltra* High-Fidelity DNA-Polymerase und die Probe wurde im Thermocycler inkubiert:

1. Präinkubation (1x) 95 °C für 30 Sekunden
2. Amplifikation (12x) 95 °C für 30 Sekunden  
55 °C für 1 Minute  
68 °C für 4 Minute

Anschließend wurde durch Zugabe von 1 µl des methylierungssensitiven Restriktionsenzym *DpnI* der Verdau der Amplifikationsprodukte bei 37 °C für 1 Stunde durchgeführt. Dieser Verdau dient dem Abbau des Templates, sodass nur das nicht-methylierte PCR-Produkt zurückbleibt. Nach dem Verdau erfolgten die Transformation in XL1-Blue-Zellen sowie die darauffolgende DNA Isolation (siehe 4.2.4 und 4.2.5).

**Tabelle 4.** Primer für die *side-directed mutagenesis*.

Primer	Sequenz	Orientierung	Schmelztemperatur
Pfwd_H20P	5'-atccttcatggagaacctgccgtggtacatggc-3'	<i>forward</i>	79,14 °C
Prev_H20P	5'-gccatgtaccacggcaggttctccatgaaggat-3'	<i>reverse</i>	79,14 °C
Pfwd_W188X	5'-ggagctaattaacaagtgagccttccaaggggaga-3'	<i>forward</i>	79,27 °C
Prev_W188X	5'-tctcccccttgaaggctcacttggttaattagctcc-3'	<i>reverse</i>	79,27 °C
Pfwd_V203A	5'-gaacccctccggagcggacaatgctgtca-3'	<i>forward</i>	78,81 °C
Prev_V203A	5'-tgacagcattgtccgctccggagggttc-3'	<i>reverse</i>	78,81 °C
Pfwd_V261A	5'-cccagagatcgcgccccccctcc-3'	<i>forward</i>	78,11 °C
Prev_V261A	5'-ggaggggggcccgcgatctctggg-3'	<i>reverse</i>	78,11 °C
Pfwd_L264F	5'-gagatcgtggcccccttctgacctcaatag-3'	<i>forward</i>	80,31 °C
Prev_L264F	5'-ctattgaggtcaggaagggggccacgatctc-3'	<i>reverse</i>	80,31 °C
Pfwd_I268T	5'-ccccctctgacctcaacagatgccatctcc-3'	<i>forward</i>	78,90 °C
Prev_I268T	5'-ggagatggcatctgttgaggtcaggagggg-3'	<i>reverse</i>	78,90 °C
Pfwd_A334T	5'-caagctgactggcacaggcgggtggtgg-3'	<i>forward</i>	80,13 °C
Prev_A334T	5'-ccaccaccgcctgtgccagtcagcttg-3'	<i>reverse</i>	80,13 °C
Pfwd_V377I	5'-ggtgcccccgcatctccatccact-3'	<i>forward</i>	78,38 °C
Prev_V377I	5'-agtggatggagatgccgggggcacc-3'	<i>reverse</i>	78,38 °C
Pfwd_H380R	5'-ggcgtctccatccgctcagccacctcc-3'	<i>forward</i>	80,13 °C
Prev_H380R	5'-ggaggtggctgagcggatggagacgcc-3'	<i>reverse</i>	80,13 °C

#### 4.1.4 Klonierung mittels Gateway System®

Ausgehend von den zehn pENTR-Plasmiden (*MVK*-Wildtyp und neun Varianten) wurde die cDNA in den Vektor pMAL-c2X kloniert. Hierbei handelt es sich um einen Vektor zur Proteinproduktion in Prokaryoten.

Die Klonierung erfolgte mittels Gateway System® von Invitrogen. Dieses basiert auf dem *sites-specific recombination system* des  $\lambda$ -Bakteriophagen (Ptashne 1992). Für die Rekombination notwendig sind einerseits Plasmide mit den Rekombinationsstellen (*att-sites*), sowie der Clonase Enzym Mix, der die Reaktion katalysiert. Bei den *att-sites* (*specific*

*attachment sites*) handelt es sich um spezifische Bindestellen für die Rekombinationsproteine (Clonase), die die Rekombination ermöglichen. Hierbei werden *attB*- (*E. coli* Chromosom) und *attP*-sites ( $\lambda$ -Phagen Chromosom), sowie die aus der Rekombination dieser beiden entstehenden *attL*- und *attR*-sites unterschieden. Die Reaktion zwischen *attB*- und *attP*-site wird genutzt zur Insertion von PCR-Produkten mit *attB*-sites in einen Donor-Vektor (pDONR), der seinerseits *attP*-sites besitzt. Es entsteht ein *Entry Clone* (pENTR) mit *attL*-sites. Die BP-Reaktion wird von der BP-Clonase katalysiert. Im Weiteren kann die cDNA ausgehend von pENTR in einen für die Expression spezifischen *Destination* Vektor (pDEST) mittels LR-Reaktion übertragen werden. Der pDEST enthält zwischen den *attR*-sites das *ccdB*-Gen, dessen Genprodukt toxisch auf Bakterien wirkt, indem es deren Gyrase hemmt. Zur Expression in *E. coli* wurde die cDNA des MVK-Wildtyps und der neun Varianten mittels LR-Reaktion in den Vektor pMAL-c2X (pDEST) gemäß dem Herstellerprotokoll übertragen. Hieraus entstanden die *Expression Clones* (pEXP). Für die LR-Reaktion wurden 1  $\mu$ l des pENTR (100 ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l pMAL-c2X (100 ng/ $\mu$ l), sowie 1  $\mu$ l LR-Clonase in einem 0,5 ml Eppendorf Tube zusammengefügt und nach leichtem Vortexen für 2 Stunden bei 25 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde zum Beenden der Reaktion dem Ansatz 1  $\mu$ l Proteinase K beigesetzt. Nach weiterem Vortexen wurde die Probe für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Zur Trennung des Reaktionsprodukt pEXP und dem ehemaligen pENTR, welcher nun das *ccdB*-Gen enthält, sowie nicht umgesetzter Edukte (pENTR und pDEST), wurde das Gemisch der vier verschiedenen DNAs in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert und anschließend auf LB-Agar mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin ausplattiert. Da nur der pDEST und folglich der pEXP eine Resistenz gegenüber Ampicillin besitzen, können nur diese anwachsen. Da jedoch der pDEST noch das *ccdB*-Gen enthält und exprimiert, können nur Bakterien mit dem pEXP zu Kolonien anwachsen.

#### **4.1.5 Transformation in *Escherichia coli***

Bei der Transformation wird freie DNA durch Bakterien in das Zellinnere aufgenommen, was zur Vervielfältigung und Klonierung notwendig ist. Die Transformation erfolgte für Produkte der *site-directed mutagenesis* in XL1-Blue-Zellen und für Produkte der Gateway Klonierung in DH5 $\alpha$ -Zellen. 1  $\mu$ l des Reaktionsprodukts wurde mit 50  $\mu$ l Zellen gemischt und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Inkubation in 42 °C warmem

Wasser für 30 Sekunden, was die Aufnahme der DNA in das Zellinnere ermöglicht. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 2 Minuten wurde 200 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 500 U/min im Thermomixer inkubiert. Zur Selektion wurden je 50 µl auf LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

#### **4.1.6 DNA-Isolierung aus *Escherichia coli***

Zur Extraktion der Plasmid DNA aus XL1-Blue- und DH5α-Zellen, die nach 16 Stunden bei 37 °C angewachsen waren, wurde das *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* verwendet. Gemäß dem Protokoll wurden je Ansatz ein Klon zu 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) gegeben und in einem 15 ml Tube bei 37 °C und 200 U/min auf dem Schüttler für 16 Stunden inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 4.600 U/min wurde der Überstand verworfen, die Zellen mittels alkalischer Lyse lysiert und die DNA aus dem Pellet gemäß den Herstellerangaben isoliert. Abschließend wurde die Konzentration der DNA, die in 50 µl Wasser eluiert wurde, mittels NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (OD-Messung bei 260 nm) bestimmt.

#### **4.1.7 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA**

Zur Überprüfung der erfolgreichen Rekombination wurde der entstandene pEXP mittels spezifischer Restriktionsenzyme verdaut und die entstandenen Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Fragmentlängen wurden dann mit den errechneten Werten und einer Negativ-Kontrolle verglichen. Der Gesamtansatz von 10 µl FastDigest Green Buffer (1x) enthielt 100 bis 200 ng DNA (pEXP) und 0,5 µl FastDigest *Sall*. Der Verdau durch die Restriktionsenzyme erfolgte für 45 Minuten bei 37 °C. Anschließend wurden 5 µl des Ansatzes auf ein 0,85 % Agarosegel aufgetragen und die Fragmente in einer horizontalen Gelapparatur bei 120 V und 130 mA innerhalb 1 Stunde aufgetrennt. Zur Abschätzung der Fragmentgröße diente der 1 kb Plus DNA Ladder.

## 4.2 Proteinproduktion und –aufreinigung

Zur nachfolgenden strukturellen und funktionellen Untersuchung des MVK-Wildtyp Proteins und der neun Varianten wurden die cDNA der Proteine in *E. coli* überexprimiert und translatiert. Die hierbei entstanden Fusionsproteine aus MVK und MBP (MVK-MBP) wurden mittels Affinitätschromatographie von den restlichen Zellbestandteilen abgetrennt (Amylosefraktion). Anschließend wurde die Oligomerisierung mittels *size-exclusion chromatography* (SEC) untersucht und die funktionellen MVK-MBP Dimere (fMVK) isoliert. Im letzten Schritt erfolgte die Abspaltung des MBP-tags und die Aufreinigung der entstandenen MVK-Dimere (cMVK) zur weiteren funktionellen und strukturellen Untersuchung.

### 4.2.1 Proteinproduktion in *Escherichia coli*

Zur Produktion der zehn MVK-Proteine wurden der pMAL-c2X Vektor (pEXP) mit der jeweiligen cDNA des MVK-Wildtyps oder einer der neun Varianten in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert und eine Vorkultur erstellt. Nach Anwachsen in 5 ml Vorkultur-Medium (LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) für 12 Stunden bei 37 °C wurden die Zellen in 2 Liter Hauptkultur (LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin und 10 % Glucose) überführt und diese auf dem Schüttler bei 37 °C inkubiert, bis die optische Dichte bei 600 nm eine Absorption von 0,5 erreichte. Die Genüberexpression wurde durch die Zugabe von *Isopropylthio-b-D-galactoside* (IPTG) bis zu einer Konzentration von 100 mmol/l induziert. Die Proteinproduktion des MVK-MBP Fusionsproteins erfolgte bei einer Temperatur von 20 °C für 20 Stunden. Anschließend wurden die Zellen mit 5.000 g für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 20 ml Säulenpuffer, in dem der Proteinnaseinhibitor Roche Complete Mini gelöst war, resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels *Sonication* lysiert. Hierbei wurde jede Probe auf Eis viermal für 45 Sekunden und einer Amplitude von 60-70 % lysiert. Die Proben wurden dann bei 4.600 U/min für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde mittels Filtropur S 0,45 Spritzenfilter filtriert.

#### 4.2.2 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Nach Lyse und Zentrifugation der *E. coli* Zellen wurde das MVK-MBP Fusionsprotein aus dem Überstand (*Crude Extract*) nach Filtrierung aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte am ÄKTApurifier bei 4 °C. Zur Trennung des MVK-MBP Fusionsproteins von den restlichen Zellbestandteilen erfolgte im ersten Schritt die Affinitätschromatographie. Nach Spülung der MBPTrap Säule mit Säulenpuffer wurde der *Crude Extract* auf die Säule mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min geladen, wobei das mit MBP-getaggte Protein auf der Säule gebunden wurde. Ungebundene Proteine wurden in mehreren Waschläufen mit dem fünffachen Säulenvolumen entfernt. Anschließend wurde das gebundene MVK-MBP Fusionsprotein mittels Maltosepuffer (Säulenpuffer mit 10 mmol/l Maltose) von der Säule bei einer Geschwindigkeit von 1 ml/min eluiert. Da Maltose eine höhere Affinität als das MBP zur Säule besitzt, kommt es zur Ablösung des MVK-MBP Proteins. Die Fraktion des eluierten Proteins (Amylosefraktion) wurde aufgefangen und für 20 Minuten bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert.

#### 4.2.3 *Size-exclusion chromatography*

Im zweiten Schritt erfolgte die *size-exclusion chromatography* (SEC) zur Auftrennung der Amylosefraktion nach Größe. Von der Größe kann die Oligomerisierung der nativen Struktur des MVK-MBP Fusionsproteins abgeleitet werden, da die verschiedenen Oligomere unterschiedliche Molekülgrößen aufweisen. Bei der SEC laufen die zu trennenden Proteine in der flüssigen Phase über die stationäre Phase der Säule. Der Trennungseffekt beruht auf den unterschiedlichen Diffusionsvolumina der Moleküle. Während kleinere Moleküle in die stationäre Phase eindringen können, gelingt dies größeren Molekülen nicht und folglich benötigen die großen Moleküle weniger Zeit zum durchfließen der Säule. Es ergibt sich eine negative Korrelation zwischen der Molekülgröße und der Retentionszeit. Zur Auftrennung der Amylosefraktion wurde der Überstand, der das lösliche MVK-MBP Fusionsprotein beinhaltet, auf die HiLoad 16/60 Superdex 200 Säule geladen. Diese Säule war zuvor mit HEPES-Puffer equilibriert worden. Die Laufgeschwindigkeit betrug 0,4 ml/min und das Eluat wurde in 1 ml große Fraktionen aufgetrennt. Auf Basis des Chromatogramms (Abb. 4 A) wurden für jeden der drei Peaks die Fraktionen gepoolt.



Um die Proteinmenge zu bestimmen, wurde die Proteinkonzentration der gepoolten Proteinfractionen mittels *Quick Start<sup>TM</sup> Bradford Protein Assay* gemessen. Die Methode basiert auf dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue, der bei Bindung an Proteine deprotoniert wird und daraufhin sein Absorptionsmaximum von der Farbe Rot ( $A_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$ ) zu Blau ( $A_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$ ) verändert (Bradford 1976). Auf einer 96-well Platte wurden je well 250  $\mu\text{l}$  Farblösung gemäß den Herstellerangaben aufgetragen. Anschließend wurden 5  $\mu\text{l}$  der sieben Bovine Serum Albumin (BSA)-Protein Standards (2, 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,25, 0,125 mg/ml) und die jeweiligen Proben aufgetragen und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Absorption wurde am FLUOstar gemessen und anhand der BSA-Protein Standards eine Standardgerade erstellt, mit der die Proteinkonzentration der Proben ermittelt wurde. Für jede Probe und jeden Standard wurden Duplikate angefertigt und anschließend der Mittelwert berechnet.

#### **4.2.4 Abspaltung des *maltose-binding protein tags***

Das dimere MVK-MBP Fusionsprotein (fMVK) aus Peak 2 (Abb. 4 A) wurde zum Abspalten des MBP-*tags* 16 Stunden bei 20 °C mit Faktor Xa inkubiert. Der Ansatz betrug 2 ml und das Verhältnis von Protease zu Protein 1 U:25  $\mu\text{g}$ . Die Reaktion wurde durch Zugabe von Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF) beendet. Die Proben wurden anschließend mit 20.000 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde auf die MBPTrap Säule mit einer Geschwindigkeit von 1,0 ml/min geladen um das geschnittene MVK-Protein vom MBP-*tag* zu trennen. Das ungebundene Protein wurde nach Säulendurchlauf aufgefangen und entsprach dem MVK-Protein, wohingegen das durch den Maltosepuffer eluierte Protein dem MBP entsprach. Die beiden Fraktionen wurden gepoolt und die jeweilige Proteinkonzentration mittels Bradford Assay ermittelt. Nach erneuter Zentrifugation mit 20.000 g für 10 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand der MVK-Protein Probe auf die SEC zu Bestimmung der Größe aufgetragen und die Fraktion des dimeren geschnittenen MVK-Proteins (cMVK) gepoolt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford Assay bestimmt.

### 4.3 *Blue native polyacrylamide gel electrophoresis*

Zur Untersuchung der Oligomerisierung der Proteine wurden die verschiedenen Proben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und weitergehend analysiert. Hierfür wurde das NativePAGE™ System verwendet.

Die Proteinproben wurden auf eine Konzentration von 0,8 mg/ml mit dem NativePAGE *Sample Buffer* gemäß Protokoll verdünnt. Nach Auftragen der Proben auf die 4-12 % Bis-Tris-Gele wurde die gesamte Apparatur auf Eis gestellt. Der Anoden- und Kathodenpuffer (*light blue cathode buffer*) wurden gemäß Protokoll aus NativePAGE *running buffer* und dem NativePAGE *cathode buffer additive* hergestellt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 1 Stunde bei 150 V und anschließend 1 Stunde bei 250 V. Zur Abschätzung der Proteingröße wurde der NativeMark *Protein Standard* verwendet. Nach Beendigung der Auftrennung wurden die Gele der Kammer entnommen und die Proteine auf dem Gel zur Fixierung denaturiert. Hierzu wurden die Gele in die Fixierlösung gelegt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Gele entweder mittels Coomassie Blue gefärbt oder es wurde ein Western Blot durchgeführt. Für die Färbung mit Coomassie wurden die Gele für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit der Coomassie-Lösung bedeckt und auf einem Schüttler bei 20 U/min platziert. Danach wurde das Gel mit *Destaining*-Lösung bedeckt und wieder auf dem Schüttler platziert. Diese wurde nach 1 Stunde gewechselt und über Nacht auf dem Schüttler belassen. Am nächsten Morgen wurde das Gel mit destilliertem Wasser gewaschen und zur Auswertung eingescannt.

### 4.4 Western Blot

Der Western Blot wurde gemäß dem *wet* Verfahren in der NativePAGE™ Gelapparatur durchgeführt. Hierbei wurden die Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm übertragen, die zuvor mit Methanol aktiviert worden war. Als Puffer wurde der NuPAGE *transfer buffer* verwendet. Die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran fand gemäß Protokoll bei 25 V für 1 Stunde statt. Anschließend wurde die Membran im *Blocking*-Puffer für 1 Stunde geblockt. Die primären Antikörper gegen MVK und MBP wurden in TBS-Puffer mit 5 % Milchpulveranteil im

Verhältnis 1:100 beziehungsweise 1:1.000 verdünnt und anschließend für 1 Stunde auf der Membran inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Puffer wurde der sekundäre Antikörper HRP *anti-goat* beziehungsweise *anti-rabbit* jeweils im Verhältnis 1:10.000 in TBS-Puffer mit 5 % Milchpulveranteil verdünnt und über Nacht auf der Membran bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS-Puffer erfolgte die Detektion. Hierfür wurde die Membran mit ECL oder Femto Super Signal inkubiert und anschließend wurden die Banden mit der DIANA III detektiert. Zur Quantifizierung der einzelnen Banden wurde die AIDA Software von Raytest verwendet.

#### 4.5 Differential Scanning Fluorimetry

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität der Proteine wurde die Methode *differential scanning fluorimetry* (DSF) eingesetzt. Grundlage der Methode bildet der Fluoreszenzfarbstoff *Sypro Orange*, dessen Fluoreszenzintensität abhängig von seiner Umgebung ist. Während es in einer wässrigen Umgebung zur Fluoreszenzauslöschung (*quenching*) kommt, führt die Bindung an hydrophobe Regionen von Proteinen zur Aufhebung dieses Effekts (*dequenching*) und damit zu einer Steigerung der Fluoreszenzintensität. Durch Temperaturerhöhung kommt es zur Entfaltung von Proteinen, was bedeutet, dass hydrophobe Gruppen aus dem Inneren des Proteins an der Oberfläche präsentiert werden. An diese bindet *Sypro Orange* und bewirkt eine Zunahme der Fluoreszenzintensität, die mit dem Grad der Entfaltung korreliert (Niesen, Berglund et al. 2007).

Die MVK-Proteine (fMVK oder cMVK) wurden in HEPES-Puffer auf eine Konzentration von 0,4 mg/ml verdünnt und *Sypro Orange* wurde im Verhältnis 1:1.000 zugegeben. Im ersten Schritt wurde die Fluoreszenz im Grundzustand bei 25 °C bestimmt und anschließend wurde die Probe mit 1 °C/min erhitzt bis maximal 70 °C. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 610 nm am 7900HT-RT-PCR gemessen. Für jede Probe wurden sechs Experimente durchgeführt.

Zur Auswertung wurde die normalisierte Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Temperatur aufgetragen und die Wendepunkte (*transition midpoints*)  $T_m$  mittels Sigmoidalfunktion berechnet. Für die fMVK wurde eine biphasische Funktion gewählt. Die

Signifikanz der Unterschiede der  $T_m$ -Werte wurde mittels *one-way* ANOVA mit Dunnett's post Test ermittelt.

#### 4.6 *Right Angle Light Scattering*

Neben der Entfaltung von Proteinen auf thermischen Stress wurde das Aggregationsverhalten mittels *right angle light scattering* (RALS) am Cary Eclipse Fluoreszenz Spektrophotometer mit einem temperaturkontrollierten Peltier Multicell Holder untersucht. Die Proteinproben wurden in HEPES-Puffer auf eine Konzentration von 0,4 mg/ml verdünnt. 120 µl Probe wurden in eine Küvette gegeben und kontinuierlich mit 1 °C/min von 25 bis 75 °C erhitzt. Das gestreute Licht wurde mittels Fluoreszenz Spektrophotometer ( $\lambda_{EM} = 335$  nm und  $\lambda_{EX} = 330$  nm) in einem 90° Winkel gemessen. Aufgrund einer möglichen Interferenz von MBP mit der Messung war das Experiment auf die als cMVK verfügbaren Proteine beschränkt. Für jedes Protein wurden drei Experimente durchgeführt. Für die Auswertung wurde die normalisierte Intensität als Maß der Trübung in Abhängigkeit der Temperatur aufgetragen. Die Steigungen sowie die Punkte der halbmaximalen Intensität  $T_{0,5}$  wurden graphisch ermittelt.

#### 4.7 *Protein unfolding kinetics*

Zur genaueren Untersuchung der konformationellen Stabilität der Proteine wurden die kinetischen Eigenschaften der Proteinentfaltung näher untersucht. Hierzu wurde die Fluoreszenzintensität von 8-Anilino-1-Naphtalenesulfonsäure (ANS) in Abhängigkeit von der Zeit bei konstanter Temperatur gemessen. ANS verhält sich ähnlich wie *Sypro Orange*. Während es in wässriger Lösung zum *quenching* kommt, führt die Bindung an hydrophobe Regionen des Proteins zu einem *unquenching* und einer damit verbundenen Steigerung der Fluoreszenzintensität. Da der MBP-tag einen Einfluss auf die Messung haben könnte, waren die kinetischen Untersuchungen auf die cMVK-Proteine beschränkt.

Jede Probe von 100 µl enthielt 4 µmol/l cMVK in HEPES-Puffer und ANS in der Konzentration von 100 µmol/l. Die Küvetten mit der Probe wurden auf dem Cary Eclipse Fluoreszenz Photospektrometer mit temperaturkontrolliertem Peltier Multicell Holder platziert. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 500 nm ( $\lambda_{EX} = 395$  nm, 5,0/10,0 nm

Spaltweite) in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Je Protein wurden 3 Experimente bei 4 verschiedenen Temperaturen durchgeführt (Wildtyp: 44, 47, 50, 54 °C, Varianten: 37, 40, 44, 47 °C). Anhand einer einphasigen Exponentialfunktion wurde die Reaktionsrate  $k$  für jedes Experiment berechnet und ihr natürlicher Logarithmus wurde gegen die inverse Temperatur in K aufgetragen. Die Steigungen  $m$  wurden mittels linearer Regression berechnet. Anhand der Arrhenius Gleichung  $k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}}$  mit ( $E_A$  = Aktivierungsenergie,  $R$  = ideale Gaskonstante,  $T$  = Temperatur in K,  $A$  = Arrhenius Faktor) wurde die Aktivierungsenergie für den Wildtyp und die Varianten bestimmt. Da  $A$  konstant ist, folgt für  $E_A = m \cdot (-R)$ . Anschließend wurden die Unterschiede der Aktivierungsenergien des Wildtypen, sowie der Varianten mittels *one-way* ANOVA mit Dunnett's post Test auf Signifikanz überprüft.

#### **4.8 Mevalonatkinase Enzymaktivitätsassay**

Die Mevalonatkinase katalysiert die Phosphorylierung von Mevalonat (MVA) zu Mevalonat-5-Phosphat (MVAP). Der Einfluss von Mutationen auf die funktionelle Enzymaktivität des varianten MVK-Proteins wurde anhand eines MVK-Aktivitätsassays untersucht. Da die residuale MVK-Aktivität in Patientenzellen deutlich erniedrigt ist und zwischen 0 und 7 % liegt (Houten, Wanders et al. 2000), wird ein sehr sensibler Assay zur Messung benötigt. Der Standardassay basiert auf der Quantifizierung der Produkte MVAP und Mevalonat-Pyrophosphat (MVAPP), die ausgehend von radioaktivem MVA gebildet werden (Hoffmann, Brendel et al. 1992). Das Ziel dieser Arbeit war es, einen alternativen Assay zu entwickeln, der leicht verfügbar, valide und leicht handhabbar ist, sowie auf Radioaktivität verzichtet.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität des Wildtyps und der Varianten wurde das jeweilige rekombinante Protein mit einer bekannten Menge an Substrat MVA und den nötigen Kosubstraten  $Mg^{2+}$  und ATP inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsprodukt MVAP mittels Tandem-Massenspektrometrie quantifiziert und die spezifische Aktivität anhand des Umsatzes von MVA zu MVAP berechnet (Reitzle, Maier et al. 2015).

#### 4.8.1 Enzymatische Reaktion von Mevalonat zu Mevalonat-5-Phosphat

Die Phosphorylierung von Mevalonat wird von der Mevalonatkinase in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  und ATP katalysiert (Tchen 1958). Basierend auf der bereits beschriebenen Methode zur Bestimmung der Mevalonatkinaseaktivität mittels radioaktivmarkiertem Substrat (Hoffmann, Brendel et al. 1992) wurde der Aktivitätsassay entwickelt. Dieser enthielt neben rekombinanter MVK TRIS-HCl als Puffer,  $MgCl_2$  und ATP. Zur Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen wurden Konzentrationen der Pufferbestandteile TRIS-HCl von 1 bis 100 mmol/l,  $MgCl_2$  von 1 bis 20 mmol/l und ATP von 1 bis 10 mmol/l variiert und in Abhängigkeit die Enzymaktivität bestimmt. Weiterhin wurde die Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes (3,8 bis 13,5) bestimmt. Der jeweilige Assay wurde in 100  $\mu$ l Aktivitätspuffer durchgeführt. Die rekombinante MVK wurde in einer Konzentration von 0,005 mg/ml für geschnittenes Protein (cMVK) und 0,01 mg/ml für fMVK-Fusionsprotein oder MVK-Amylosefraktion eingesetzt. Zum Start der Reaktion wurde 1 mmol/l Mevalonat hinzugegeben. Die Probe wurde anschließend für 2 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mittels Proteinausfällung durch Zugabe von Acetonitril gestoppt. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 20.000 g wurde der Überstand der Probe für die massenspektrometrische Bestimmung von MVAP vorbereitet.

#### 4.8.2 Quantifizierung von Mevalonat-5-Phosphat mittels *isotope dilution*

##### Tandem-Massenspektrometrie

Die Quantifizierung des Reaktionsprodukts MVAP erfolgte mittels *isotope dilution* Tandem-Massenspektrometrie, wie von Reitzle, Maier et al. beschrieben (Reitzle, Maier et al. 2015). Zu 50  $\mu$ l Probe wurden 50  $\mu$ l des internen Standards gegeben, der das Isotop [ $^{13}C$ ,  $^2H_3$ ]-DL-Mevalonat-5-Phosphat in einer Konzentration von 50  $\mu$ mol/l enthielt. Nach Durchmischung wurde die Probe unter Verwendung von Stickstoff vollständig evaporiert. Anschließend wurde der Probe 50  $\mu$ l Butanol-HCl hinzugefügt und für 45 Minuten bei 75 °C inkubiert, sodass das MVAP, sowie der interne Standard zum entsprechenden Butylester derivatisierte. Nach Zentrifugation für 2 Minuten bei 15.000 g und erneuter Evaporation wurden die Probe in 1.000  $\mu$ l Wasser/Acetonitril im Verhältnis 1:1 gelöst. Die Probe wurde 1:100 mit Wasser/Acetonitril verdünnt und im *ultra performance liquid chromatography* (UPLC)-Autosampler zur Durchführung der Tandem-Massenspektrometrie platziert.

Die UPLC gefolgt von der Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-MS/MS) erfolgte am Waters UPLC System, das aus einem Autosampler, einer temperaturkontrollierten Chromatographiesäule (Acquity UPLC HSS T3 mit  $2,1 \times 100$  mm;  $1,8 \mu\text{m}$ ) und dem hieran gekoppelten Tandem-Massenspektrometer Xevo TQ-S besteht. 20  $\mu\text{l}$  der Probe wurden auf die Chromatographiesäule aufgetragen, die konstant auf  $35^\circ\text{C}$  temperiert war. Die mobile Phase bestand aus zwei Lösungen, Lösung A (Wasser) und Lösung B (Acetonitril). Die Säule wurde initial mit 90 % Lösung A und 10 % Lösung B kalibriert. Die Laufzeit nach Injektion der Probe betrug 5 Minuten bei konstanter Laufgeschwindigkeit von 0,4 ml/min. Das Verhältnis der Lösungen A und B verhielt sich wie in der folgenden Übersicht dargestellt (Tabelle 5).

**Tabelle 5.** Programm des UPLC-Chromatographie (nach Reitzle, Maier et al. 2015)

Zeitintervall	Lösung A	Lösung B
0,5 Minuten	90 %	10 %
2,5 Minuten	Linearer Abfall auf 45 %	Lineare Steigerung auf 55 %
0,5 Minuten	Linearer Abfall auf 10 %	Lineare Steigerung auf 90 %
0,5 Minuten	10 %	90 %
0,2 Minuten	Lineare Steigerung auf 90 %	Linearer Abfall auf 10 %
0,8 Minuten	90 %	10 %

Lösung A (Wasser), Lösung B (Acetonitril)

Anschließend erfolgte die Massenspektrometrie am Xevo TQ-S mittels *Elektrospray-Ionization* im negativen Modus und den in Tabelle 6 aufgeführten Einstellungen. Für die Detektion des Butylesters von MVAP und des internen Standards ( $[^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3]$ -DL-Mevalonat-5-Phosphat) wurden die Massenübergänge 283,2 zu 96,9 beziehungsweise 287 zu 96,9 beobachtet.

Die Auswertung erfolgte mit dem TargetLynx Method Editor (V4.1 SCN 843) mit den folgenden Einstellungen: (*smoothing method: mean, smoothing iterations: 2, smoothing width: 3, polynomial type: linear, origin: force, weighting function: none*).

**Tabelle 6.** Einstellungen des *Xevo TQ-S* (nach Reitzle, Maier et al. 2015)

<b>Einstellung</b>	
<i>Capillary voltage</i>	1,56 kV
<i>Source offset</i>	50,0 V
<i>Source temperature</i>	150 °C
<i>Desolvation temperature</i>	500 °C
<i>Desolvation gas flow</i>	1.000 l/h
<i>Cone gas flow</i>	150 l/h
<i>Nebulizer gas flow</i>	7,00 bar
<i>Collision gas flow</i>	0,15 ml/min
<i>Cone voltage for Analyte</i> <sup>1</sup>	50 V
<i>Collision energy for Analyte</i> <sup>1</sup>	12 eV
<i>Cone voltage for internal standard</i> <sup>1</sup>	44 V
<i>Collision energy for internal standard</i> <sup>1</sup>	16 eV

<sup>1</sup> Die Werte wurden jeweils für MVAP und den internen Standard optimiert

### 4.8.3 Validierung der Tandem-Massenspektrometrie

Die Methode wurde gemäß der *FDA Guidance for industry bioanalytical method validation* (FDA 2001) validiert. Zur Überprüfung der Linearität der Quantifizierung von MVAP wurden sieben Probenstandards mit unterschiedlichen MVAP-Konzentrationen (0,5, 2,5, 5,0, 25, 50, 125 und 250 µmol/l) in 5 unabhängigen Versuchsserien analysiert. Zur Bestimmung der Genauigkeit sowie intra- und interassay Impräzision wurden drei Qualitätskontrollproben mit einer MVAP-Konzentration von 1, 5, 37,5 und 100 µmol/l in je fünf unterschiedlichen Versuchen quantifiziert und hieraus die Abweichung zur errechneten Konzentration bestimmt. Gemäß der FDA Kriterien wird eine bioanalytische Methode als genau (*accurate*) angesehen, wenn die Abweichung des gemessenen Mittelwerts weniger als 15 % vom tatsächlichen Wert beträgt, mit Ausnahme der Untergrenze der Messung (*lower limit of quantification; LLOQ*), für den eine Abweichung von  $\leq 20$  % akzeptiert wird. Als präzise (*precise*) wird eine Methode bewertet, wenn der Variationskoeffizient  $\leq 15$  % beträgt außer für den LLOQ ( $\leq 20$  %).

Zum Ausschluss eines Einflusses der Matrix der zu untersuchenden Probe auf die Ionisation des Analyten (MVAP) und der internen Standards erfolgte ein *post column infusion* Experiment (Annesley 2003). Durch die Injektion einer Kontrolllösung, die den reinen Butylester von MVAP oder des internen Standards enthielt, wurde ein konstantes MS/MS-



Signal erzeugt. Die Konzentration der Lösungen betrug 0,1 mg/l und die Laufgeschwindigkeit der Injektionspumpe 5 µl/min. Die Injektion der Kontrolllösung erfolgte mittels T-förmigem Verbindungstück in den Ablauf der Chromatographiesäule. Verschiedene Proben des Aktivitätsassays wurden anschließend injiziert und der Einfluss der Probenmatrix auf das Hintergrundsignal überprüft. Zur Untersuchung von Nebensignaleffekten (*cross-talk effects*) wurde entweder MVAP oder der interne Standard injiziert und die anderen MS/MS-Kanäle auf Störungen hin beobachtet.

Zur Bestimmung der Probenstabilität wurde die MVAP-Konzentration von Proben mit einer bekannten Konzentration quantifiziert, nachdem diese für 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden oder dreimal eingefroren und anschließend wieder aufgetaut wurden. Die Stabilität des MVAP-Butylesters wurde nach Lagerung für 1 Tag sowie 1 Woche (7 Tage) überprüft.

Abschließend wurde die Impräzision des gesamten Mevalonatkinase Aktivitätsassays bestimmt, der die Durchführung der enzymatischen Reaktion, die Probenvorbereitung, sowie die Quantifizierung des MVAP enthielt. Hierzu wurde die Enzymaktivität des rekombinanten MVK-Wildtyps 8x an drei verschiedenen Tagen gemessen (n = 24) und der Variationskoeffizient berechnet.

#### **4.8.4 Berechnung der kinetischen Parameter**

Die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  der Mevalonatkinase wurden mittels Veränderung der Konzentrationen von Mevalonat,  $Mg^{2+}$  und ATP bestimmt und mittels der Michaelis-Menton-Gleichung in GraphPad Prism 5 berechnet.

### **4.9 Genotyp, Phänotyp und residuale Enzymaktivität**

Der Phänotyp der MKD korreliert mit der residualen Mevalonatkinaseaktivität in Zellen von MKD-Patienten. Zur Aufklärung des Zusammenhangs zwischen Genotyp und Phänotyp wurden die Daten der strukturellen und funktionellen Charakterisierung varianter MVK-Proteine mit der residualen Enzymaktivität aus MKD-Patientenzellen verglichen.

Die genetischen, klinischen und biochemischen Daten von Patienten wurden nach drei Kriterien ausgewählt: (1) HIDS, MA oder MKD-Diagnose, (2) zwei nachgewiesene MVK-Mutationen und (3) Information über die zugehörige residuale MVK-Aktivität. Die Analyse beschränkte sich auf Genotypen, die eine der neun untersuchten Mutationen beinhalteten. Heterozygote Patienten wurden ausgeschlossen, da diese möglicherweise eine zweite bisher unbekannte MVK-Mutation tragen könnten, die zu einer fehlenden mRNA Expression führen könnten (Drenth, Cuisset et al. 1999, Cuisset, Drenth et al. 2001). Obwohl dieses Phänomen auch bei einem Patienten mit homozygotem Nachweis der Mutation V377I berichtet wurde (Cuisset, Drenth et al. 2001), schloss die Studie homozygote Patienten nicht aus. In Summe wurden die Daten von 103 pädiatrischen und erwachsenen MKD-Patienten analysiert. Daten von 11 Patienten stammten aus dem Dr. von Haunerschen Kinderspital (n = 11; (Stojanov, Lohse et al. 2004) und nicht veröffentlichte Daten). Weitere Daten wurden mittels Literaturrecherche in der PubMed Datenbank, unter Verwendung der Suchbegriffe *“hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome”*, *“HIDS”*, *“mevalonic aciduria”*, *“MA”*, *“mevalonate kinase deficiency”*, *“MKD”* erhoben (n = 92; (Hinson, Chambliss et al. 1997, Drenth, Cuisset et al. 1999, Houten, Kuis et al. 1999, Houten, Romeijn et al. 1999, Cuisset, Drenth et al. 2001, Frenkel, Houten et al. 2001, Houten, Koster et al. 2001, Houten, Frenkel et al. 2002, Prietsch, Mayatepek et al. 2003, Simon, Drewe et al. 2004, Simon, Kremer et al. 2004, Mandey, Schneiders et al. 2006, Bader-Meunier, Florkin et al. 2011, Tahara, Sakai et al. 2011, Messer, Alsaleh et al. 2016)).

Die MVK-Aktivität wurde in Leukozyten, PBMC oder Fibroblasten von MKD-Patienten bestimmt und relativ zum Mittelwert der Kontrolle (MVK-Wildtyp) angegeben. Bei neun Patienten wurde die MVK-Aktivität in zwei unterschiedlichen Gewebetypen bestimmt, jedoch wurden zur Wahrung der Konsistenz alle Datenpunkte in die Auswertung einbezogen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Patienten in zwei unterschiedliche Publikationen eingeschlossen und somit doppelt berücksichtigt wurden. Der Vergleich der Enzymaktivitäten bei verschiedenen Genotypen erfolgte mittels Berechnung des Signifikanzniveaus unter Verwendung von *one-way* ANOVA mit Dunett’s post test.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Auswirkungen von Mutationen im *MVK*-Gen auf die native Struktur der Mevalonatkinase

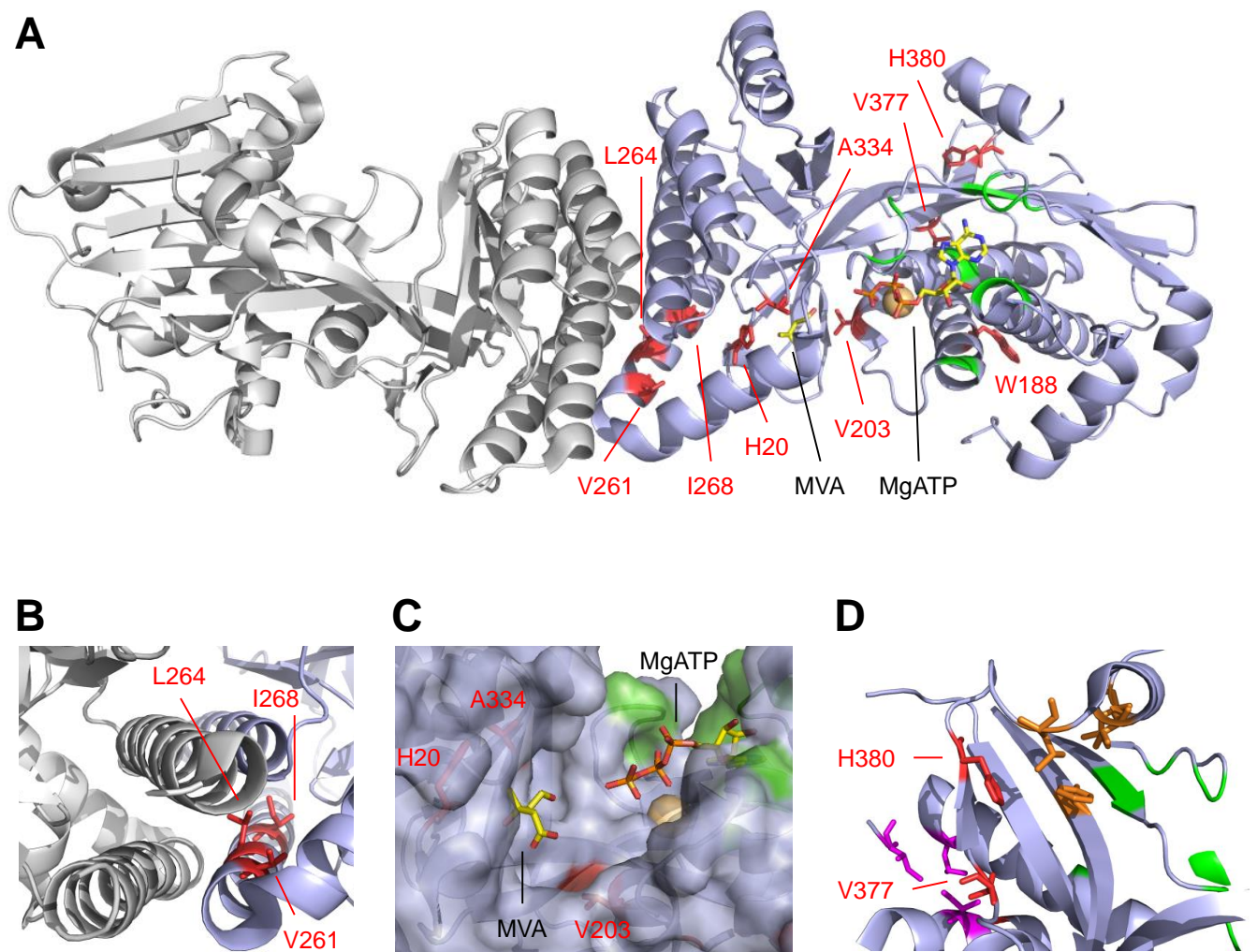
#### 5.1.1 Strukturelle Visualisierung der untersuchten Mutationen

Gemäß dem Infevers Register (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/> abgerufen am 18. März 2018) sind derzeit 212 Mutationen im *MVK*-Gen bekannt, von welchen 132 mit MKD, HIDS oder MA assoziiert sind (Sarrauste de Menthier, Terriere et al. 2003, Touitou, Lesage et al. 2004). Die neun untersuchten Mutationen sind über das gesamte *MVK*-Gen verteilt und mit unterschiedlichen Phänotypen verknüpft. Um die Konsequenzen der einzelnen Aminosäuresubstitutionen auf das *MVK*-Protein zu beurteilen, wurde eine 3D-Struktur anhand der vorhandenen Kristallisationsdaten erstellt (Fu, Voynova et al. 2008) und die Lage der untersuchten Mutationen zu den funktionellen und strukturellen Domänen in Bezug gesetzt (Abb. 6A).

Im nativen Zustand bildet die *MVK* in Lösung ein Homodimer, wobei jedes Monomer aus zwei strukturellen Domänen, einer N- und einer C-terminalen, besteht, die wiederum verschiedene funktionelle Domänen beinhalten. In der C-terminalen Domäne befindet sich die Dimerisierungsdomäne, die aus mehreren  $\alpha$ -helices gebildet wird. Drei der untersuchten Aminosäuresubstitutionen, V261, L264 und I268 sind in der Dimerisierungsdomäne lokalisiert (Abb. 6B).

Die Seitenketten dreier weiterer Aminosäuren H20, V203 und A334, deren Varianten in dieser Studie untersucht wurden, befinden sich an der Verbindung der zwei strukturellen C- und N-terminalen Domänen, die die mögliche Substratbindestelle markiert (Abb. 6C). Das katalytische Zentrum sowie die ATP-Bindestelle sind ebenfalls in der N-terminalen Domäne nicht weit der Mevalonat-Bindestelle lokalisiert, allerdings sind die Aminosäureketten der untersuchten Mutationen nicht in dieser Domäne lokalisiert.

Die Aminosäuren V377 und H380, deren Mutationen ebenfalls untersucht wurden, sind am Ende der C-terminalen Domäne in einer hydrophoben Region lokalisiert, wobei H380 Teil des hydrophoben Kerns ist (Abb. 6D).



**Abbildung 6.** Lokalisation der von *MVK*-Mutationen betroffenen Aminosäuren

3D-Struktur der dimeren Mevalonatkinase. (A) Das Monomer A ist in blau, das Monomer B in grau dargestellt. Das aktive Zentrum ist in grün und die von Mutationen betroffenen Seitenketten sind im Monomer A in rot markiert. (B) Die Aminosäuren V261, L264 und I268 sind Teil der Dimerisierungsdomäne. (C) Die Höhle zwischen der N- und C-terminalen Domäne des Proteins bildet die Substratbindestelle, die in räumlicher Nähe zu den Aminosäuren H20, V203 und A334 steht. (D) Die Seitenkette der Aminosäure V377 befindet sich nahe des C-Terminus und ist Teil einer hydrophoben Region (magenta), genauso wie H380, die Teil des hydrophoben Kerns (orange) ist. Die Abbildung basiert auf PDB 2r3v nach Fu et al. 2008.

Die neun untersuchten Mutationen sind in den unterschiedlichen funktionellen Domänen des Proteins lokalisiert. Jedoch betreffen die Mutationen nicht das katalytische Zentrum, sodass der Funktionsverlust des MVK-Proteins nicht durch einen primären Verlust der katalytischen Aktivität erklärt werden kann, sondern durch einen anderen Pathomechanismus, der die Struktur des Proteins betrifft, verursacht werden muss.

### 5.1.2 Oligomerisierung des Mevalonatkinase Wildtyps

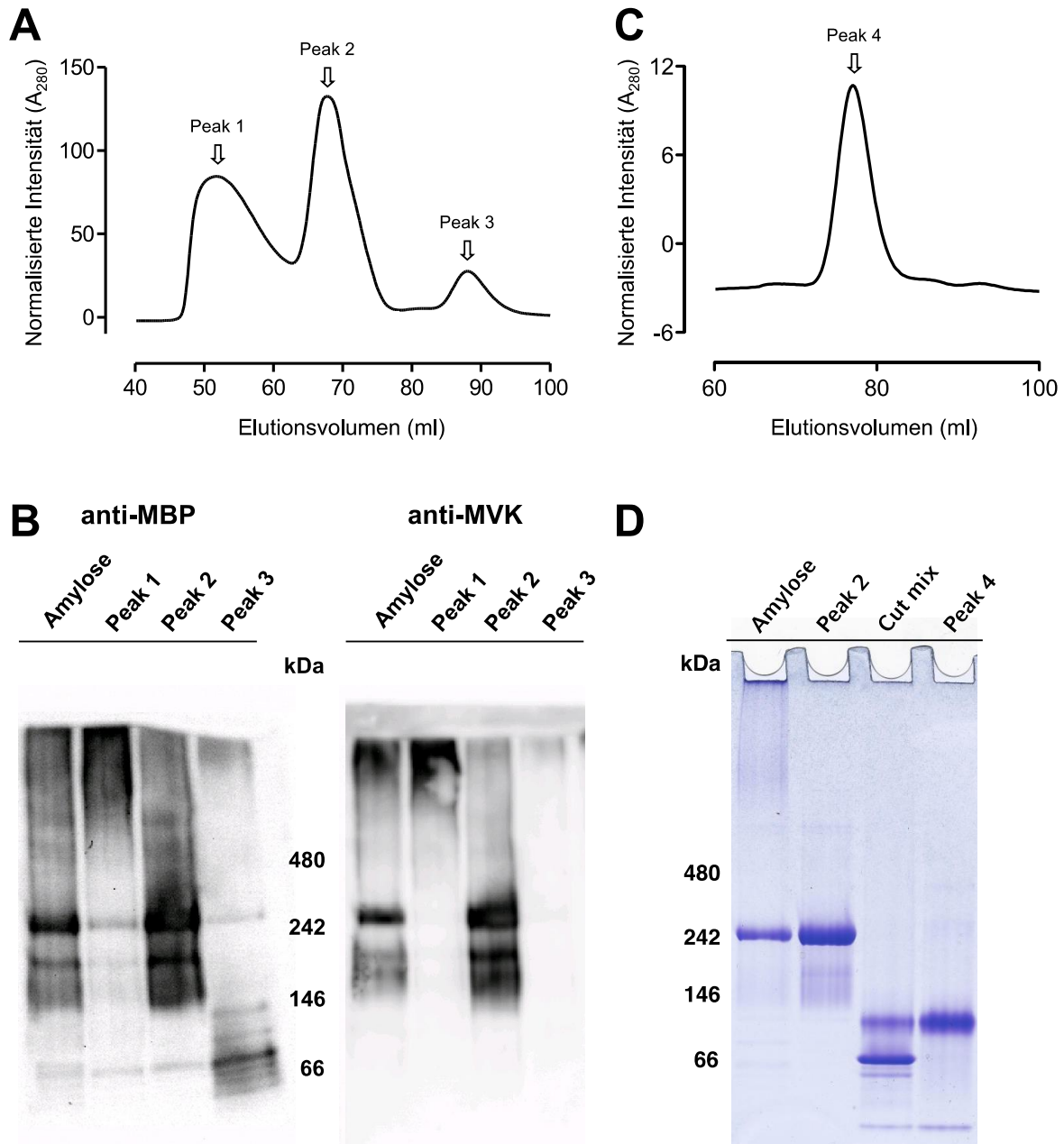
Zur Untersuchung der strukturellen Konsequenzen von Mutationen auf das Mevalonatkinase Protein wurde das MVK-Wildtyp Protein und die varianten Proteine aus *E. coli* aufgereinigt und die Oligomerisierung mittels *size-exclusion chromatography* (SEC) untersucht.

Die Mevalonatkinase wurde hierbei als Fusionsprotein mit dem *maltose-binding protein* (MBP)-tag exprimiert und translatiert. Der MBP-tag hat einerseits stabilisierende Wirkung auf Proteine, andererseits dient er der Affinitätschromatographie bei der das MVK-MBP Fusionsprotein (Amylosefraktion) von den restlichen Proteinen separiert wird. Das MVK-Wildtyp Fusionsprotein wurde anhand der SEC nach Größe aufgetrennt und es ergab sich ein Diagramm mit drei Peaks (Abb. 7A). Für jeden der drei Peaks wurden die entsprechenden Fraktionen gepoolt und mittels *blue native polyacrylamide gel electrophoresis* (BN-PAGE) aufgetrennt. Anschließend erfolgte mittels Western Blot die Anfärbung mit je einem Antikörper gegen MVK und MBP (Abb. 7B).

Für Peak 1 zeigte sich in beiden Western Blots keine eindeutige Bande, jedoch je eine schwer abgrenzbare Anfärbung mit einer Größe von über 480 kDa, die wahrscheinlich löslichen Aggregaten von MVK-MBP entspricht. Peak 2 zeigte in beiden Western Blots eine Bande in der Höhe von 242 kDa, die der erwarteten Größe des MVK-MBP Dimers entspricht. Für Peak 3 fand sich nur eine Bande in Höhe von 66 kDa, die nur vom MBP-Antikörper angefärbt wurde. Hierbei handelt es sich möglicherweise um abgespaltenes MBP.

Somit enthielt Peak 2 die stabilen Dimere des MVK-MBP Fusionsproteins (fMVK). Weder im Western Blot noch in der SEC ließen sich MVK-MBP Monomere nachweisen. Im nächsten Schritt wurde der MBP-tag mittels der Protease Faktor Xa abgetrennt und das geschnittene MVK-Dimer (cMVK) auf der SEC von den restlichen Bestandteilen getrennt (Abb. 7C). Die Reinheit wurde mittels BN-PAGE überprüft. Hierbei fand sich eine einzelne Bande knapp unter der Marke von 146 kDa, die dem funktionellen MVK-Dimer entsprach (Abb. 7D). Auch hier ließen sich keine MVK-Monomere nachweisen.

Die Untersuchung der Oligomerisierung ergab, dass der MVK-Wildtyp hauptsächlich als lösliches Dimer bei geringem Nachweis löslicher Aggregate vorliegt. Dieses Ergebnis entspricht den Daten aus der Literatur (Fu, Wang et al. 2002).



**Abbildung 7.** Oligomerisierung des MVK-Wildtyp Proteins

(A) Das Chromatogramm zeigt die Auftrennung mittels SEC des MVK-MBP Fusionsprotein nach Produktion in *E. coli* (Amylosefraktion). (B) Die drei Peaks (1, 2 und 3) sowie die Amylosefraktion wurden mittels BN-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit anti-MBP und anti-MVK angefärbt. Anschließend erfolgte die Abspaltung des MBP-tags vom dimeren MVK-MBP Fusionsproteins (Peak 2) durch Inkubation mit Faktor Xa für 16 Stunden und anschließender MBP-Affinitätschromatographie. (C) Das Chromatogramm zeigt die erneute Auftrennung mittels SEC des Schneideansatzes (*cut mix*). (D) Dargestellt ist die Coomassie Färbung nach elektrophoretischer Auftrennung mittels BN-PAGE.

### 5.1.3 Oligomerisierung varianter Mevalonatkinase

Um die Auswirkungen der Mutationen auf die Oligomerisierung und Stabilität des nativen MVK-Proteins zu untersuchen, wurden die Varianten nach prokaryoter Expression und Translation als Fusionsprotein mittels SEC aufgetrennt und die Chromatogramme mit dem des Wildtyps verglichen.

Die Chromatogramme der fMVK-Varianten ließen sich in zwei Gruppen teilen. Während für die Varianten W188X, L264F und H380R keine Dimere nachweisbar waren, zeigten die anderen sechs Varianten klare Dimer-Peaks, die in ihrer Höhe variierten (Abb. 8A).

Die *nonsense* Mutation W188X resultiert in einem verkürzten Protein, dem ein Teil der katalytischen und die komplette Dimerisierungsdomäne fehlen, daher ist es plausibel, dass sich im Chromatogramm dieser Mutante keine Dimere nachweisen ließen. Bei H380R wird ein Histidin im hydrophoben Bereich des Proteins, das einen Imidazolring besitzt, durch ein einfaches Arginin ersetzt. L264F resultiert im Austausch eines Leucins im Bereich der Dimerisierungsdomäne durch ein Phenylalanin, das einen aromatischen Ring trägt. Alle drei Varianten zeigten einen Verlust des Dimer-Peaks, vereinbar mit einem schwerwiegenden strukturellen Defekt. Zusätzlich zeigte W188X eine erhebliche Aggregationsneigung.

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den anderen sechs Varianten mit Ausnahme von H20P um Austausche strukturell ähnlicher Aminosäuren. Die Variante H20P führt zum Austausch eines Histidins durch ein Prolin. Alle sechs Varianten zeigten einen Dimer-Peak des Fusionsproteins. Während V203A und V377I als fMVK vergleichbare Dimer-Peaks mit einem leichten Nachweis von Aggregaten zeigten, war die Oligomerisierung der anderen Varianten stärker beeinträchtigt (Abb. 8A). Die Mutationen V261A, I268T und A334T führten zu einer leicht vermehrten Aggregation bei moderat reduziertem Dimer-Peak. Die Variante H20P resultierte in einer deutlich verstärkten Aggregation und einem stark verkleinerten Dimer-Peak.

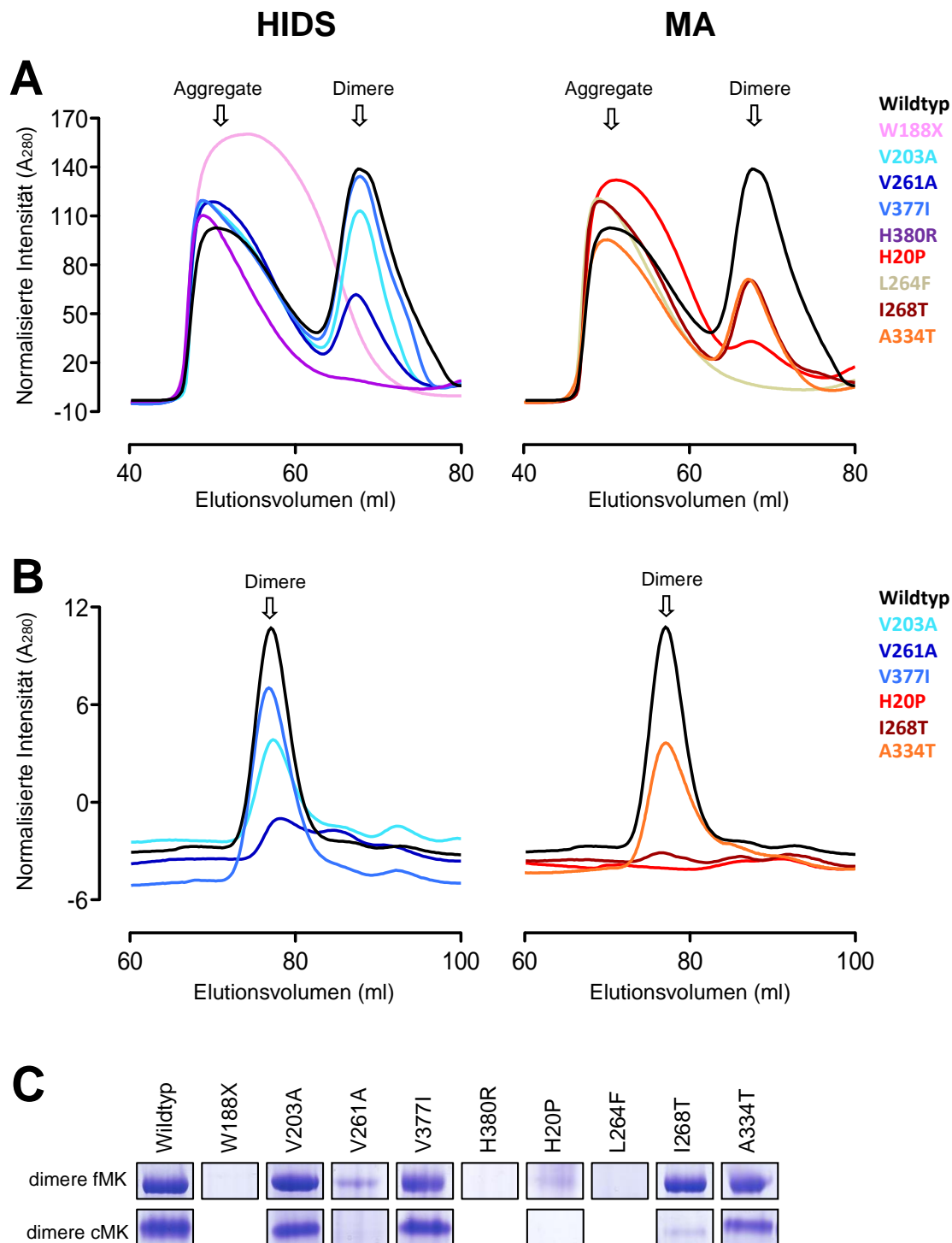
Im Anschluss folgte für Varianten mit vorhandenen fMVK-Dimeren (H20P, V203A, V261A, I268T, A334T und V377I) die proteolytische Abspaltung des MBP-tags und die erneute Auftrennung der entstanden cMVK mittels SEC. Hierbei zeigten die Varianten V203A, A334T und V377I einen moderat reduzierten Dimer-Peak (Abb. 8B). Für die Varianten

H20P, V261A und I268T konnten nach Abspaltung des MBP-tags keine Dimere nachgewiesen werden. Da MBP stabilisierend auf Proteine wirkt, ließ dies auf eine beeinträchtigte konformationelle Stabilität dieser drei Varianten schließen.

Zur Überprüfung der Oligomerisierung und der Reinheit der aufgereinigten Proteine wurde die varianten Proteine mittels BN-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie, einem blauen Farbstoff, der an Proteine bindet, angefärbt. Es bestätigte sich das Ergebnis des vorangegangenen Versuchs. Während für V203A, V261A, I268T, A334T und V377I deutliche fMVK-Dimer Banden zu sehen waren, fehlten diese bei W188X, L264F und H380R vollständig (Abb. 8C). Für H20P zeigte sich eine deutlich abgeschwächte fMVK-Dimer Bande. Nach der proteolytischen Abspaltung des MBP-tags war nur für drei Varianten, V203A, A334T und V377I, eine cMVK-Dimer Bande nachweisbar.

Zusammengefasst führen die Mutationen im *MVK*-Gen zu einer unterschiedlich starken Beeinträchtigung der nativen Proteinstruktur. Bei den Varianten, die mit HIDS assoziiert sind, kommt es zum Austausch strukturell ähnlicher Aminosäuren. So verhielten sich V203A und V377I ähnlich dem Wildtyp. V261A zeigte eine leichte Beeinträchtigung und benötigte die Stabilisierung durch MBP. Obwohl W188X und H380R auch mit HIDS assoziiert sind, konnten für beide Varianten keine Dimere nachgewiesen werden. Während für die MA-Variante L264F ebenfalls kein Dimer-Peak nachgewiesen werden konnte, zeigte die Variante A334T eine mit dem Wildtyp vergleichbare Stabilität. H20P und I268T waren nur als fMVK stabil und benötigten den stabilisierenden Effekt von MBP.





**Abbildung 8.** Variante Mevalonatkinase Proteine zeigen eine gestörte Oligomerisierung

Auf der linken Seite dargestellt sind MVK-Varianten, die mit HIDS assoziiert sind und auf der rechten Seite MVK-Varianten, die mit MA verknüpft sind. (A) Abgebildet sind die SEC-Chromatogramme des MVK-Wildtyps sowie der MVK-Varianten nach Produktion in *E. coli* als MVK-MBP Fusionsprotein und anschließender Affinitätschromatographie. Die Pfeile markieren lösliche Aggregate sowie dimere MVK-MBP Fusionsproteine (fMVK). (B) Dargestellt sind die SEC-Chromatogramme des MVK-Wildtyps und der sechs MVK-Varianten, die einen fMVK-Dimerpeak aufwiesen, nach Abspaltung des MBP-tags durch Inkubation mit Faktor Xa für 16 Stunden und erneuter Affinitätschromatographie. Die Pfeile markieren geschnittene MVK-Dimere ohne MBP-tag (cMVK). (C) Die Oligomerisierung und Reinheit der MVK-Varianten als fMVK und cMVK wurde anschließend mittels *blue native polyacrylamide gel electrophoresis* überprüft.

## 5.2 Thermodynamische Stabilität varianter Mevalonatkinase Proteine

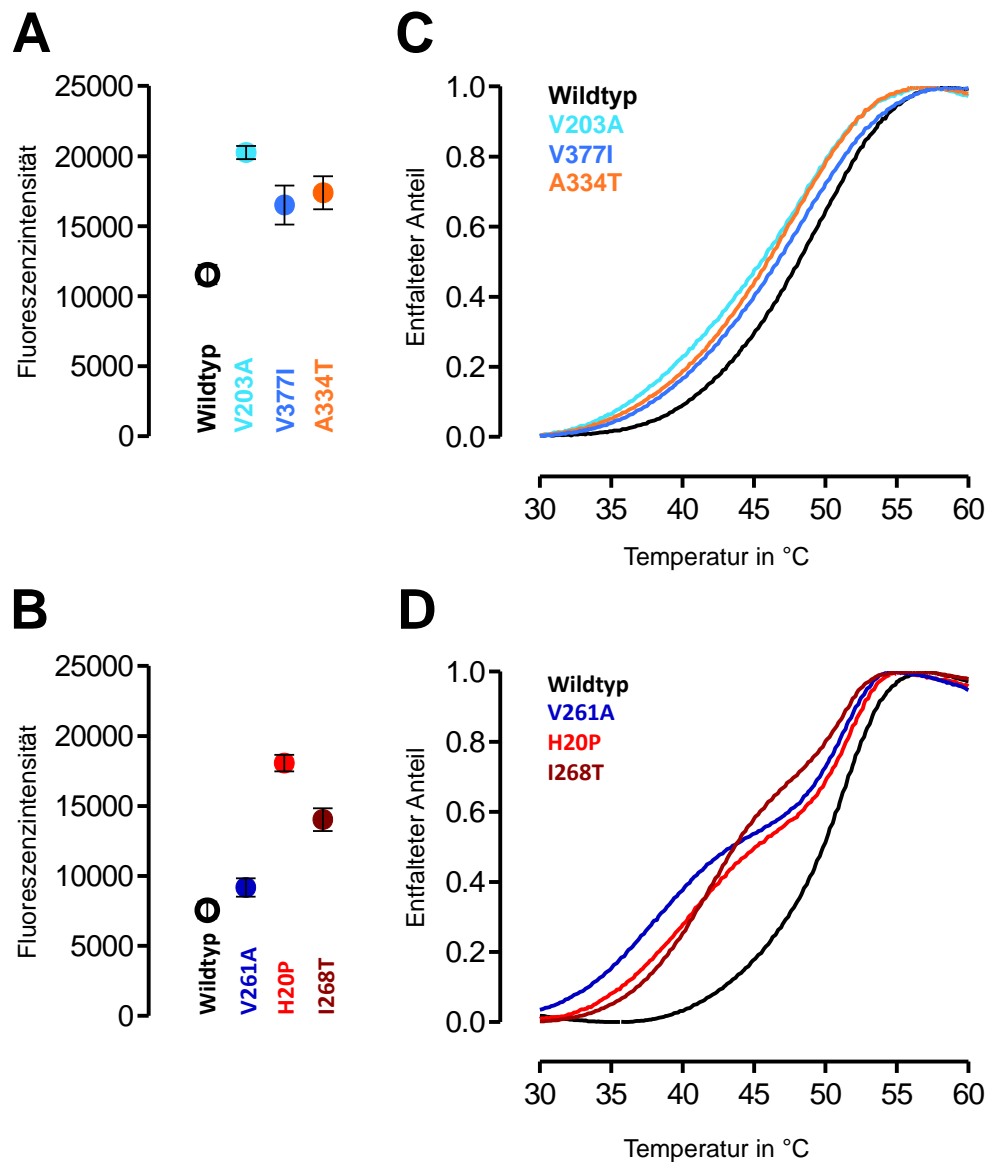
### 5.2.1 Entfaltung varianter Mevalonatkinase in Abhängigkeit von der Temperatur

Bei der MKD handelt es sich um ein periodisches Fiebersyndrom. Folglich sind die Zellen und deren Proteine häufig thermischem Stress ausgesetzt. Um die Auswirkung von Mutationen auf die Reaktion der Proteine gegenüber thermischem Stress zu überprüfen, wurden *differential scanning fluorimetry* (DSF)-Experimente durchgeführt. Hierbei wird das aufgereinigte Protein mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Sypro Orange* versetzt. Während eine wässrige Umgebung bei *Sypro Orange* zur Fluoreszenzauslöschung (*quenching*) führt, kommt es nach der Bindung an hydrophobe Regionen eines Proteins zu einer Aufhebung dieses Effekts (*unquenching*). Mittels DSF wurde erst die Fluoreszenz bei Raumtemperatur ermittelt, die die Hydrophobizität des Proteins im Grundzustand reflektiert (Abb. 9A und B). Anschließend wurde die Temperatur der Proteinlösung kontinuierlich gesteigert. Die Energiezufuhr führt zur Entfaltung des Proteins und damit zur Exposition von hydrophoben Aminosäuren an der Proteinoberfläche. An diese bindet *Sypro Orange*, was zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität führt (Abb. 9C und D).

Die DSF-Experimente wurden mit den sechs Varianten (H20P, V203A, V261A, I268T, A334T und V377I), die als stabiles Dimer verfügbar waren, durchgeführt. Da nicht alle Varianten als cMVK stabil waren, wurden die fMVK- und cMVK-Proteine mit dem jeweiligen fMVK- oder cMVK-Wildtyp verglichen. Bereits im Grundzustand zeigten alle MVK-Varianten erhöhte Fluoreszenzintensitäten, was auf eine erhöhte Hydrophobizität im Grundzustand schließen lässt und auf eine partielle Entfaltung bereits bei Raumtemperatur hinweist. Die höchste Intensität wies H20P bei den fMVK-Proteinen und V203A bei den cMVK-Proteinen auf. Einzig V261A zeigte nur eine moderat erhöhte Fluoreszenz im Grundzustand (Abb. 9A und B).

Die Temperaturzunahme bewirkte beim cMVK-Wildtyp ab 35 °C einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität, der ab 55 °C in einem Plateau mündete (Abb. 9C). Zum Vergleich des Wildtyps und der Varianten wurde der zugehörige  $T_m$  (*transition midpoint*) mittels Sigmoidalfunktion berechnet (Tabelle 7). Für den cMVK-Wildtyp ergab sich ein  $T_m$  von 48,2 °C. Der fMVK-Wildtyp zeigte einen ähnlichen Kurvenverlauf, der jedoch nach rechts zu höheren Temperaturen verschoben war, mit einem  $T_m$  von 49,9 °C (Abb. 9B). Die Varianten

V203A, V377I und A334T zeigten einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf wie der Wildtyp (Abb. 6C). Jedoch waren die Kurven nach links zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Dies drückte sich in signifikant erniedrigten  $T_m$ -Werten aus (Tabelle 7). Für die Varianten H20P, V261A und I268T ergab sich ein zweiphasiger Kurvenverlauf mit einer sehr deutlichen Linksverschiebung und stark erniedrigten  $T_m$ -Werten (Abb. 9D und Tabelle 7).



**Abbildung 9.** Variante Mevalonatkinase Proteine zeigen eine partielle Entfaltung im Grundzustand und eine beeinträchtigte thermische Stabilität

Analyse der thermischen Stabilität des Wildtyps und der Varianten wurde mittels *differential scanning fluorimetry* (DSF) gemessen. (A und B) Darstellung des Mittelwerts und der Standardabweichung der Fluoreszenzintensität im Grundzustand bei Raumtemperatur für geschnittenen MVK-Dimere (cMVK) (A) und MVK-MBP Fusionsproteine (fMVK) (B) aus je 6 unabhängigen Versuchen. (C und D) Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Temperatur für cMVK-Varianten (C) und fMVK-Varianten (D). Für jede Variante sind die Mittelwerte der Intensität aus sechs Datenpunkten je Temperaturmesspunkt wiedergegeben.

**Tabelle 7.** *Transition midpoints* ( $T_m$ ) der thermischen Entfaltung des Wildtyps und der varianten Mevalonatkinase Proteine

cMVK	$T_m$ in °C	SD	p	fMVK	$T_m$ in °C	SD	p
Wildtyp	48,2	0,53		Wildtyp	49,9	0,41	
V203A	45,6	0,71	< 0,001	V261A	38,5	0,18	< 0,001
V377I	46,7	0,98	< 0,001	H20P	40,6	0,22	< 0,001
A334T	45,9	0,84	< 0,001	I268T	41,9	0,11	< 0,001

cMVK = Geschnittenen MVK-Dimere; fMVK = Dimere MVK-MBP Fusionsprotein;  
SD = Standardabweichung

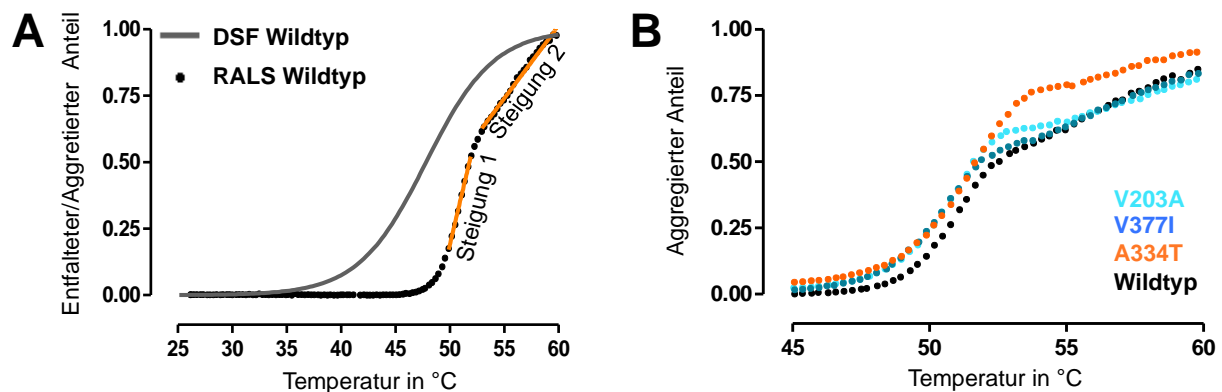
Zusammengefasst zeigten alle untersuchten Mutationen bereits im nativen Zustand eine erhöhte Hydrophobizität. Zusätzlich führten sie auch zu einer erhöhten Thermosensitivität. Während dieser Effekt für die stabileren cMVK-Varianten (V203A, V377I, A334T) moderat ausfiel, zeigten V261A, H20P und I268T eine deutlich stärkere Anfälligkeit gegenüber einer Veränderung der Temperatur. Allgemein unterstützt diese Beobachtung die Hypothese der Proteinfehlfaltung.

## 5.2.2 Aggregationsverhalten der varianten Mevalonatkinase Proteine

Eine Steigerung der Temperatur kann nicht nur zur Entfaltung sondern auch zur Aggregation von Proteinen führen. Die SEC-Daten zeigten bereits, dass die Varianten W188X und H20P im Grundzustand zur Aggregation neigen. Mittels *right angle light scattering* (RALS) kann die Trübung (*turbidity*) der Proteinlösung in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht werden. Diese korreliert mit der Aggregation von Proteinen. Aufgrund der Interferenz des MBP-tags mit der Messung konnten diese Experimente nur mit den drei Varianten (V203A, A334T und V377I) durchgeführt werden, die als cMVK stabil waren.

Für den Wildtyp ergab sich ein zweiphasiger Verlauf. Erst stieg die Trübung steil an, flachte im zweiten Teil leicht ab, um bei 60 °C ein Plateau zu erreichen (Abb. 10). Die Temperatur  $T_{0,5}$ , bei der die halbmaximale Trübung erreicht wurde, betrug für den Wildtyp 51,8 °C. Im Vergleich zur Entfaltung (DSF) erfolgte die Aggregation erst bei deutlich höheren Temperaturen. Die Varianten V203A und V377I zeigten einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf (Abb. 10). Bei A334T hielt die erste Phase der Aggregation länger an, um dann einen flacheren Kurvenverlauf zu nehmen und auch bei 60 °C in ein Plateau zu münden. Die  $T_{0,5}$

der Varianten waren mit der des Wildtyps vergleichbar und auch die Kinetik der Aggregation, die durch die Steigung dargestellt wird, verhielt sich ähnlich (Tabelle 8). Für die Varianten V203A, A334T und V377I konnten somit keine signifikanten Auffälligkeiten im Aggregationsverhalten festgestellt werden.



**Abbildung 10.** Aggregationsverhalten varianter Mevalonatkinase bei thermischem Stress

Die Aggregation wurde mittels *right angle light scattering* (RALS) über die Untersuchung der Trübung in Abhängigkeit der Temperatur bestimmt und mit den *differential scanning fluorimetry* Ergebnissen verglichen. (A) Aggregation und Entfaltung des Mevalonatkinase Wildtyps bei thermischem Stress. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt und die Steigung der Aggregationskurve (orange) wurde visuell bestimmt. (B) Die Aggregation der MVK-Varianten wurden in Abhängigkeit der Temperatur bestimmt ( $n = 3$ ) und die Mittelwerte für jeden Messpunkt aufgetragen.

**Tabelle 8.** Parameter der Aggregationsgeschwindigkeit, welche mittels *right angle light scattering* (RALS) bestimmt wurden

cMVK	$T_{0,5}$ in °C	SD	p	Steigung 1 $\pm$ SD	Steigung 2 $\pm$ SD
Wildtyp	51,8	0,48		$0,173 \pm 0,018$	$0,055 \pm 0,003$
V203A	51,1	0,35	ns	$0,180 \pm 0,011$	$0,037 \pm 0,002$
A334T	51,5	1,34	ns	$0,173 \pm 0,036$	$0,029 \pm 0,012$
V377I	51,2	0,47	ns	$0,156 \pm 0,010$	$0,051 \pm 0,003$

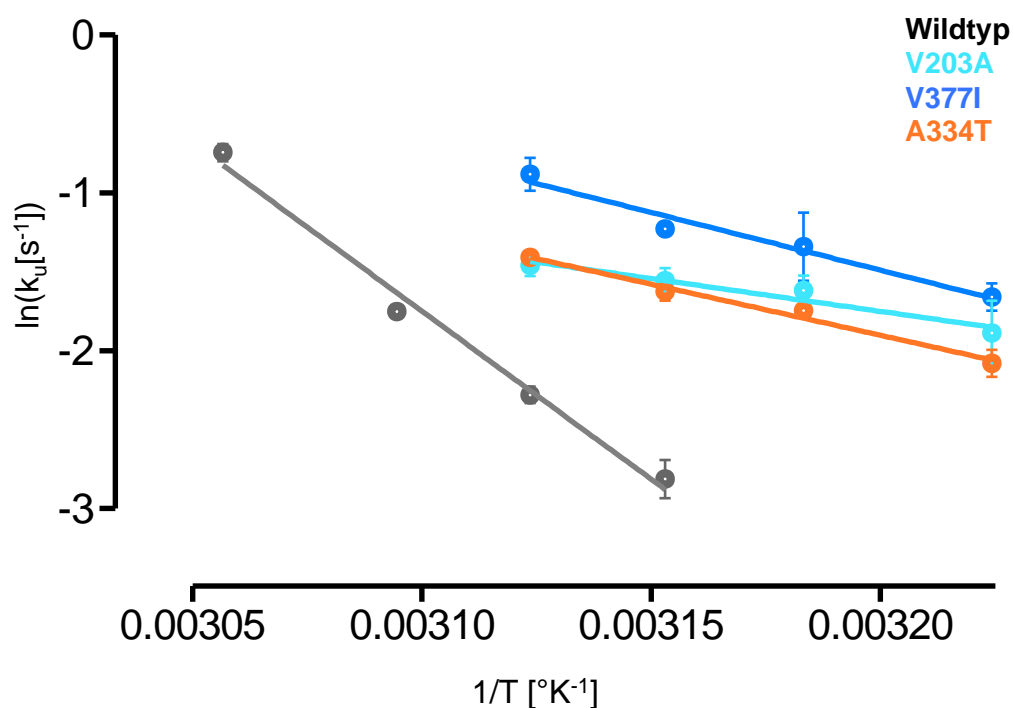
cMVK = Geschnittenen MVK-Dimere; SD = Standardabweichung; ns = nicht signifikant

Die beschleunigte oder bereits bei niedrigeren Temperaturen einsetzende Aggregation kann bei Proteinfaltungserkrankungen beobachtet werden. Die drei hier untersuchten Varianten zeigten jedoch keine Auffälligkeiten in ihrem Aggregationsverhalten.

### 5.2.3 Kinetische Untersuchung der varianten Mevalonatkinase Proteine

In den DSF-Experimenten zeigten die drei Varianten V203A, A334T und V377I eine relativ hohe thermische Stabilität mit einer etwas früheren Entfaltung im Vergleich zum Wildtyp. Zur Überprüfung der Relevanz dieses Unterschieds erfolgte die Charakterisierung der Kinetik der Entfaltung. Normalerweise befinden sich Proteine in einem Equilibrium zwischen gefaltetem und ungefaltetem Zustand, das verschiedenen Einflüssen unterliegt (u.a. Temperatur, Umgebungsfaktoren, sowie auch Mutationen). Der nativ gefaltete Zustand ist der energetisch günstigste und kann durch Zufuhr von Energie in einen ungünstigeren, entfalteten überführt werden (Anfinsen 1973). Um zu untersuchen, wie viel Energie für die Entfaltung nötig ist wurden der MVK-Wildtyp und die varianten Proteine einer konstanten Temperatur ausgesetzt und die Entfaltung über die Zeit mittels 1-Anilinonaphthalene-8-Sulfonsäure (ANS)-Fluoreszenz gemessen. ANS verhält sich ähnlich wie *Sypro Orange*. In wässriger Umgebung kommt es zur Fluoreszenzauslöschung und bei Bindung an hydrophobe Gruppen des Proteins wird dieser Effekt aufgehoben. Anhand der Reaktionsgeschwindigkeit (Entfaltungsgeschwindigkeit)  $k$  kann mittels der Arrhenius Gleichung die zur Entfaltung nötige Aktivierungsenergie  $E_A$  berechnet werden. Da auch in diesem Experiment das MBP mit der Messung interferieren würde, wurden die Experimente nur für die cMVK-Varianten V203A, A334T und V377I durchgeführt.

Die Reaktionsgeschwindigkeit  $k$  stieg für den cMVK-Wildtyp mit Erhöhung der Temperatur an und bei Überführung in den Arrhenius Plot zeigte sich eine Gerade mit negativer Steigung (Abb. 11). Hieraus ergab sich eine Aktivierungsenergie  $E_A$  von 177,2 kJ/mol (Tabelle 9). Die Mutationen V203A, A334T und V377I zeigten eine deutliche Beschleunigung der Reaktion mit höheren Reaktionsgeschwindigkeiten. Hieraus ergaben sich Geraden mit einer vom Betrag her deutlich geringeren Steigung, die sich in signifikant reduzierten Aktivierungsenergien widerspiegelte (Abb. 11 und Tabelle 9).



**Abbildung 11.** Kinetik der Entfaltung varianter Mevalonatkinase im Vergleich zum Wildtyp

Die temperaturinduzierte Entfaltung wurde mittels Zunahme der ANS-Fluoreszenz bei 500 nm gemessen. Für den MVK-Wildtyp und die Varianten wurden für vier Temperaturen (Wildtyp: 44, 47, 50, 54 °C; Varianten: 37, 41, 44, 47 °C) je drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der Messungen wurden mittels einer einphasigen exponentiellen Gleichung ermittelt und deren natürlicher Logarithmus gegen den Kehrwert der Temperatur in K aufgetragen (Arrhenius Plot).

**Tabelle 9.** Entfaltungskinetik der MVK-Varianten im Vergleich zum Wildtyp

cMVK	Steigung	SD	$r^2$	$E_A$ in kJ/mol	SD	p
Wildtyp	-21.310	1.618	0,99	177,2	13,5	
V203A	-4.151	733	0,94	34,5	6,1	< 0,0001
A334T	-6.471	559	0,99	53,8	4,6	< 0,0001
V377I	-7.318	946	0,97	60,8	7,7	< 0,0001

cMVK = Geschnittene MVK-Dimere; SD = Standardabweichung

Hieraus ließ sich ableiten, dass die varianten MVK-Proteine sich in einem energetisch deutlich ungünstigeren Zustand befinden und somit weniger Energie benötigt wird, um die Proteine in einen ungefalteten und damit nicht funktionellen Zustand zu überführen.

Die Charakterisierung der Auswirkungen der Mutationen auf die thermische Stabilität und deren Kinetik lässt erkennen, dass die Mutationen zu einer unterschiedlich starken Beeinträchtigung der resultierenden Proteine führen. Während sich für die drei Varianten V203A, A334T und V377I im Aggregations- und Entfaltungsverhalten in den DSF- und RALS-Experimenten nur ein geringer Unterschied zum Wildtyp zeigte, führten die Mutationen H20P, V261A und I268T zu einer deutlich stärkeren Sensibilität gegenüber thermischem Stress. Die genauere Untersuchung der Varianten V203A, A334T und V377I offenbarte jedoch eine deutliche Reduktion der Entfaltungsschwelle. Folglich weisen alle untersuchten Varianten eine Beeinträchtigung der konformationellen Stabilität und damit die Charakteristika einer Proteinfaltungserkrankung auf. Diese unterscheiden sich jedoch in der Intensität der Ausprägung.

### **5.3 Einfluss von Mutationen auf die funktionellen Eigenschaften der Mevalonatkinase**

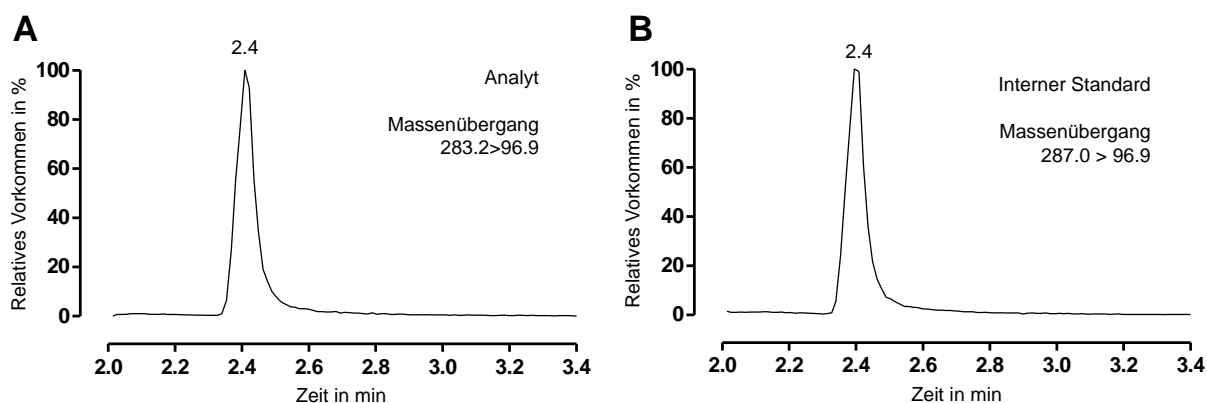
#### **5.3.1 Entwicklung eines neuen, auf Tandem-Massenspektrometrie basierendem Mevalonatkinase Aktivitätsassays**

Nicht nur strukturelle Veränderungen varianter MVK-Proteine können zum Funktionsverlust und damit zur MKD führen, sondern auch die direkte Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität. Die residuale MVK-Aktivität in Patientenzellen ist deutlich erniedrigt und liegt zwischen 0 und 7 % (Houten, Wanders et al. 2000). Als Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer MVK-Aktivitätsassay entwickelt und publiziert (Reitzle, Maier et al. 2015), der aufgrund seiner hohen Sensitivität eine genaue Unterscheidung auch niedriger spezifischer Aktivitäten erlaubt.

Hierzu wurde die Quantifizierung von MVAP, dem Produkt der Mevalonatkinase, nach Auftrennung mittels *ultra performance liquid chromatography* gefolgt von der *isotope dilution* Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-MS/MS) etabliert. Um die Sensitivität zu erhöhen, wurden MVAP, sowie der interne Standard [ $^{13}\text{C}^2\text{H}_3$ ]-DL-Mevalonat-5-Phosphat mit Butanol-HCl derivatisiert. Die Retentionszeit von MVAP und des internen Standards betrug 2,4 min, wie aus dem repräsentativen UPLC-MS/MS-Chromatogramm hervorgeht (Abb. 12). Die Methode verhielt sich über den gemessenen Konzentrationsbereich von 0,5 bis 250  $\mu\text{mol/l}$  MVAP linear mit einem  $R^2$  von 0,99. Die Untergrenze der Quantifizierung (*lower*



*limit of quantification* LLOQ) war mit 5,0 fmol (auf der Säule) sehr niedrig. Weiterhin zeigte der Assay eine hohe Genauigkeit von  $\pm 2,7 \%$  und eine Impräzision von  $< 11 \%$  (Tabelle 10). Hiermit erfüllt die Methode die Kriterien der *Guidance for Industry for Bioanalytical Method Validation* der *Food and Drug Administration* (FDA 2001). Eine Interferenz zwischen Analyt (MVAP) und dem internen Standard wurde ausgeschlossen. Weiterhin ergab sich kein Anhalt für einen Einfluss der restlichen Pufferbestandteile auf die Quantifizierung von MVAP.



**Abbildung 12.** Repräsentatives UPLC-MS/MS-Chromatogramm für die Quantifizierung von Mevalonat-5-Phosphat

Die dargestellten Chromatogramme zeigen die Peaks einer 70  $\mu\text{mol/l}$  Mevalonat-5-Phosphat (MVAP) Probe, welche mit dem internen Standard [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}_3$ ]-DL-Mevalonat-5-Phosphat versetzt wurde und anschließend mit *n*-butanol derivatisiert wurde. Die Butylester von MVAP (A) und des internen Standards (B) eluierten zur gleichen Zeit von 2,4 Minuten (nach Reitzle, Maier et al. 2015).

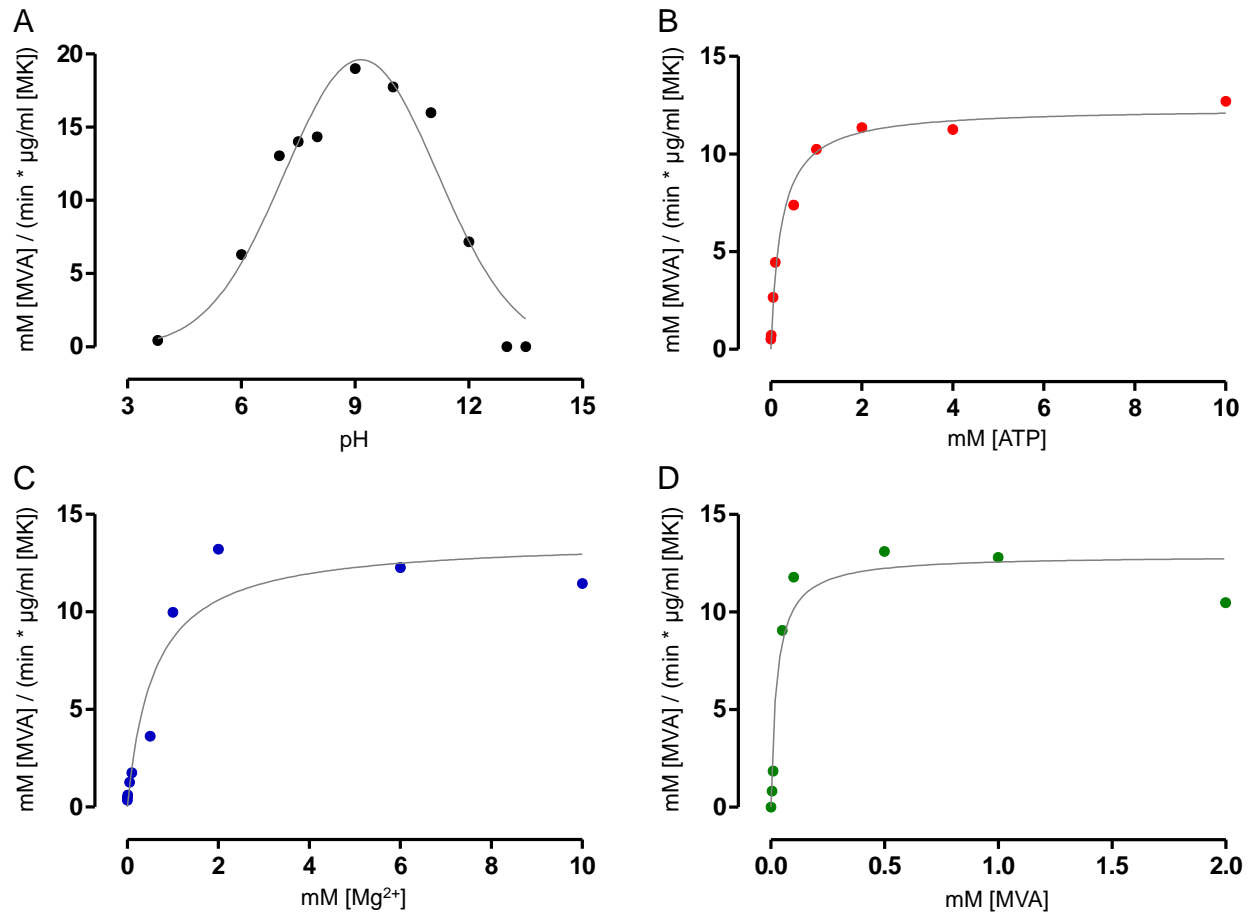
**Tabelle 10.** Analytische Genauigkeit und Impräzision der Quantifizierung von MVAP anhand der Messung der Proben zur Qualitätskontrolle (QC) (nach Reitzle, Maier et al. 2015)

Probenkonzentration	LLOQ, 0,5 $\mu\text{mol/l}$	QC 1, 1,5 $\mu\text{mol/l}$	QC 2, 37,5 $\mu\text{mol/l}$	QC 3, 100 $\mu\text{mol/l}$	Pool, $\approx 70 \mu\text{mol/l}$
Mittel der gemessenen Konzentration	0,5	1,5	37,6	100,8	
Genauigkeit [%] (n = 5)	98,0	97,3	100,3	100,8	
CV Intraassay [%] (n = 5)	10,7	6,7	2,8	1,2	2,5
CV Interassay [%] (n = 5)	8,2	8,8	0,4	3,6	5,2

CV = Variationskoeffizient

Nach der Etablierung der massenspektrometrischen Quantifizierung von MVAP erfolgte die Entwicklung des MVK-Aktivitätsassay. Die Reaktion von MVA zu MVAP wird von der MVK in Anwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$  und ATP katalysiert (Potter and Mizziorko 1997). Basierend auf der Zusammensetzung des bisherigen Aktivitätsassays (Hoffmann, Brendel et al. 1992)

wurden die Pufferbestandteile ( $\text{Mg}^{2+}$ , ATP und MVA) und Puffereigenschaften (pH, Salzkonzentration) variiert und die Enzymaktivität bestimmt (Abb. 13).



**Abbildung 13.** Die Mevalonatkinase Aktivität in Abhängigkeit von pH, ATP,  $\text{Mg}^{2+}$  und ihrem Substrat Mevalonat

Dargestellt ist die Enzymaktivität des rekombinanten MVK-Wildtyp Proteins in Abhängigkeit des pH (A), sowie den Kosubstraten ATP (B) und  $\text{Mg}^{2+}$  (C) und ihres Substrats Mevalonat (MVA) (D). Die Enzymkinetik in Abhängigkeit vom Substrat Mevalonat, sowie den Kosubstraten folgte einer Michaelis-Menten Gleichung, mit deren Hilfe die Affinitäten berechnet wurden (nach Reitzle, Maier et al. 2015).

Die Proteinfunktion von MVK war maßgeblich von der Salzkonzentration des 2-Amino-2-Hydroxymethyl-Propan-1,3-diol (TRIS)-HCl-Puffers abhängig und für Konzentrationen  $< 20$  mmol/l konnte keine Enzymaktivität gemessen werden. Für TRIS-HCl Konzentrationen  $> 100$  mmol/l war die Funktion des Enzyms unabhängig von der Salzkonzentration. Weiterhin erreichte die MVK im pH-Bereich zwischen 7,0 und 11,0 eine optimale Funktion (Abb. 13A). Die Enzymfunktion zeigte eine Abhängigkeit von den Kosubstraten  $\text{Mg}^{2+}$  und ATP bis zu einer Konzentration von jeweils 2 mmol/l. Bei höheren Konzentrationen verhielt

sich die Reaktionsgeschwindigkeit konstant (Abb. 13B und C). Die zugehörigen Affinitäten betrugen für  $\text{Mg}^{2+}$   $K_m[\text{Mg}^{2+}]$  0,59 mmol/l ( $R^2 = 0,93$ ) mit einer  $V_{\max}[\text{Mg}^{2+}]$  von  $13,7 \frac{\mu\text{mol}[\text{MVA}]}{\text{min} \times \text{mg}[\text{MVK}]}$  und für ATP  $K_m[\text{ATP}]$  0,22 mmol/l ( $R^2 = 0,99$ ) mit einer  $V_{\max}[\text{ATP}]$  von  $12,4 \frac{\mu\text{mol}[\text{MVA}]}{\text{min} \times \text{mg}[\text{MVK}]}$ .

Unter Berücksichtigung der optimalen Bedingungen (100 mmol/l TRIS-HCl, 6 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 4 mmol/l ATP, pH 7,0) verlief die Reaktion zwischen 30 und 600 Sekunden linear ( $R^2 \geq 0,99$ ). Zuletzt zeigte die Reaktionsgeschwindigkeit der MVK eine Abhängigkeit vom Substrat MVA im Bereich von 0,005-0,1 mmol/l und erreichte danach ein Plateau. Die Affinität betrug  $K_m[\text{MVA}]$  0,027 mmol/l ( $R^2 = 0,94$ ) mit einer  $V_{\max}[\text{MVA}]$  von  $12,9 \frac{\mu\text{mol}[\text{MVA}]}{\text{min} \times \text{mg}[\text{MVK}]}$ . Die Impräzision der gesamten Enzymassays und der Quantifizierung des MVAP ergab auf Basis mehrfacher Messungen 8,3 %.

Der neu entwickelte MVK-Aktivitätsassay stellt somit eine robuste und valide Methode zur Bestimmung der MVK-Aktivität dar. Er ermöglicht die genaue Untersuchung der spezifischen Aktivität rekombinanter MVK auf Basis der Quantifizierung von MVAP mittels *isotope dilution* Tandem-Massenspektrometrie.

### 5.3.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität varianter Mevalonatkinase

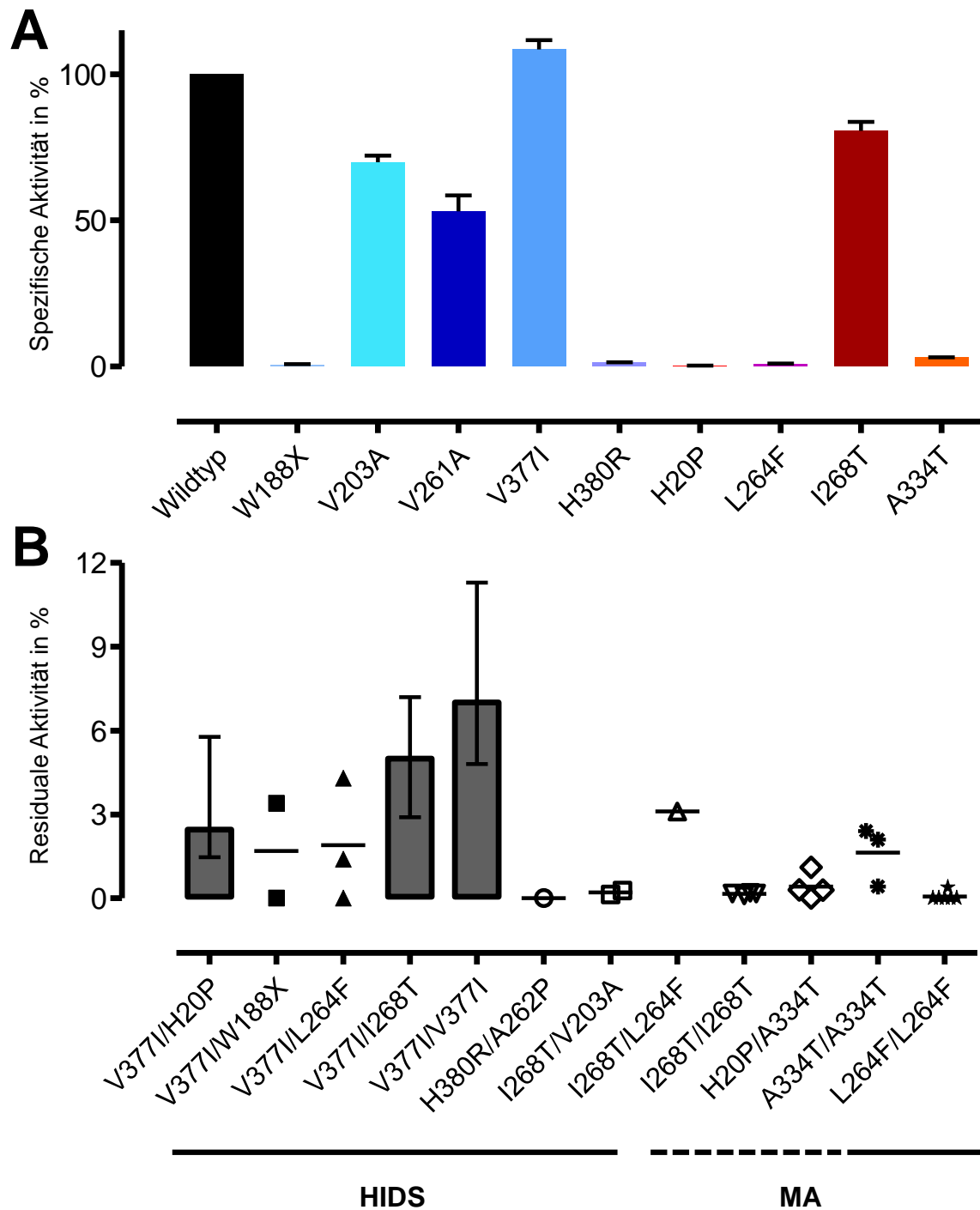
Bei der Charakterisierung der Auswirkungen von Mutationen auf die katalytischen Eigenschaften des MVK-Proteins wird zwischen residualer und spezifischer MVK-Aktivität unterschieden. Die residuale Aktivität bezieht sich auf die Restaktivität gemessen in Zellen (PBMC oder Fibroblasten) von MKD-Patienten. Die residuale Aktivität setzt sich aus der intrazellulären MVK-Proteinmenge sowie der spezifischen Aktivität des MVK-Proteins zusammen. Mutationen im *MVK*-Gen können sowohl zu konformationeller Instabilität und in Folge verminderter MVK-Proteinmenge, als auch zu Veränderung der katalytischen Eigenschaften führen, die sich in einer verminderten spezifischen Aktivität widerspiegelt. Somit erlaubt die Messung der spezifischen Aktivität des aufgereinigten rekombinanten dimeren MVK-Proteins die Charakterisierung der katalytischen Aktivität unabhängig von der konformationellen Instabilität. Darüber hinaus lassen sich die Mutationen separat

untersuchen, sodass der Einfluss einzelner Mutationen bei einem *compound* heterozygoten Genotyp differenziert werden kann.

Die spezifische Aktivität wurde für alle neun varianten Proteine bestimmt und anschließend mit dem jeweiligen Wildtyp verglichen, das heißt die cMVK-Varianten V203A, A334T und V377I wurden mit dem cMVK-Wildtyp, die fMVK-Varianten H20P, V261A und I268T wurden mit fMVK-Wildtyp und die Varianten W188X, L264F und H380R wurden mit der Amylosefraktion des Wildtyps verglichen (Abb. 14A).

Für die Varianten H20P, W188X und L264F ließ sich keine signifikante spezifische Aktivität feststellen. Die Variante H380R führte zu einer sehr deutlichen Reduktion der Aktivität auf 1,4 % im Vergleich zum Wildtyp. Auch für A334T ergab sich nur eine geringe spezifische Aktivität von 3,1 %. V203A, V261A und I268T zeigten eine moderate, aber statistisch signifikante Reduktion der spezifischen Aktivität, die 50 bis 80 % betrug. Einzig die Variante V377I resultierte in keiner Beeinträchtigung der spezifischen Aktivität verglichen mit dem Wildtyp.

Zusammengenommen zeigten vier der neun Varianten eine nur moderat reduzierte oder nicht veränderte spezifische Aktivität. Interessanterweise sind diese vier Varianten mit dem HIDS-Phänotyp (V203A, V261A, I268T und V377I) assoziiert, wobei I268T zusätzlich beim MA-Phänotyp auftritt. Die Variante A334T, die mit dem schwereren MA-Phänotyp verknüpft ist, zeigte eine stark eingeschränkte Enzymfunktion. Für die restlichen Varianten H20P, W188X, L264F und H380R, bei welchen bereits eine stark verminderte Proteinstabilität festgestellt wurde, konnte kaum eine spezifische Aktivität gemessen werden.



**Abbildung 14.** Auswirkungen von Mutationen im *MVK*-Gen auf die spezifische und residuale Mevalonatkinase Aktivität

(A) Dargestellt ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung der spezifischen Aktivität varianter Mevalonatkinase Proteine im Vergleich zum Wildtyp ( $n = 5$ ). Die Enzymaktivität wurde mittels Quantifizierung des Produkts Mevalonat-5-Phosphat basierend auf Tandem-Massenspektrometrie bestimmt. (B) Die residualen Aktivitäten ( $n = 103$ ) von MKD-Patienten mit zwei dokumentierten *MVK*-Mutationen wurden in Abhängigkeit des Genotyps aufgetragen. Genotypen mit mehr als 3 Werten sind als Säulendiagramm wiedergegeben, die den Median und die *inter quartile range* darstellen.

### 5.3.3 Residuale Mevalonatkinase Aktivität in Abhängigkeit vom Genotyp

Die spezifische Aktivität dient der Charakterisierung des isolierten MVK-Proteins, kann jedoch nur bedingt eine Aussage über deren Relevanz *in vivo* treffen. Um die Wechselwirkungen zwischen Genotyp und Phänotyp zu verstehen, ist es erforderlich, neben der strukturellen und funktionellen Analyse, auch die Funktion im zellulären Kontext zu analysieren (residuale Aktivität). Hierzu wurden verfügbare Daten von MKD-Patienten aus der Literatur sowie von Patienten aus dem Dr. von Haunerschen Kinderspital für die von uns untersuchten Mutationen zusammengetragen und ausgewertet. Die residualen Aktivitäten wurden in Fibroblasten oder Blutzellen gemessen.

Die residuale Aktivität der MKD-Patienten war generell deutlich erniedrigt gegenüber der Kontrolle (Wildtyp) und zeigte im Median eine Aktivität von 3,6 % mit einem *interquartile range* (IQR) von 1,4 % bis 6,9 % (Abb. 14B). Nach einer Unterteilung anhand des Phänotyps ergibt sich für die Gruppe der HIDS-Patienten eine Aktivität von im Median 4,6 % (IQR 2,1 % bis 7,3 %) und für die Gruppe der MA-Patienten eine signifikant niedrigere Aktivität von im Median 0,22 % (IQR 0,00 % bis 0,59 %).

Die höchste Aktivität zeigten Patienten, die homozygote Träger der Mutation V377I waren, mit im Median 7,0 % (IQR 4,8 % bis 11,3 %). Hierauf folgte die Patientengruppe mit dem *compound* heterozygoten Genotyp V377I/I268T, der eine residuale Aktivität von im Median 5,0 % (IQR 2,9 % bis 7,2 %) ergab und damit signifikant geringer als die der V377I/V377I Träger war (Tabelle 11). Die homozygoten Träger der Mutation I268T zeigten mit einem Median 0,17 % (IQR 0,12 % bis 0,19 %) eine im Vergleich zu V377I/V377I und V377I/I268T drastische Erniedrigung der Aktivität (Tabelle 11). Der *compound* heterozygote Genotyp V203A/I268T zweier Patienten zeigte eine vergleichbare residuale Aktivität mit der homozygoten Träger von I268T (Abb. 14B). Interessanterweise zeigte ein Patient mit dem Genotyp L264F/I268T eine Aktivität von 3,1 %, wohingegen für homozygote Träger der Mutation L264F keine residuale Aktivität messbar war. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei drei Patienten mit dem Genotyp L264F/V377I eine höhere residuale Aktivität im Vergleich zur Homozygotie von L264F. Die Mutation A334T führte im homozygoten Zustand auch zu einer starken Reduktion der residualen Aktivität auf 1,3 % (IQR 0,27 % bis 2,3 %). Der *compound* heterozygote Genotyp H20P/A334T führte zu einer noch stärkeren Reduktion der

Enzymfunktion. Patienten mit dem Genotyp H20P/V377I zeigten hingegen eine residuale Aktivität von im Median 2,5 % (IQR 1,5 % bis 5,8 %). Für die Variante W188X waren nur Daten im *compound* heterozygoten Zustand verfügbar, die eine deutliche Erniedrigung der MVK-Aktivität zeigten. Gleiches galt für die Variante H380R, für die nur die Daten eines Patienten mit dem Genotyp A262P/H380R verfügbar waren, und sich keine messbare residuale Aktivität feststellen ließ.

**Tabelle 11.** Residuale Mevalonatkinase Aktivität in Abhängigkeit des Genotyps

MVK-Genotyp	n	MVK-Aktivität (Median) in %	p	Vergleich
V377I/H20P	22	2,5	< 0,001	vs. V377I/V377I
V377I/L264F	3	1,4	< 0,05 ns	vs. V377I/V377I vs. L264F/L264F
V377I/I268T	33	5,0	< 0,01 ns	vs. V377I/V377I vs. I268T/I268T
V377I/V377I	19	7,0		
I268T/I268T	5	0,17	< 0,001	vs. V377I/V377I
H20P/A334T	4	0,30	ns ns	vs. V377I/H20P vs. A334T/A334T
A334T/A334T	3	1,3	< 0,01	vs. V377I/V377I
L264F/L264F	6	0,0	< 0,001	vs. V377I/V377I

Berechnung des Signifikanzniveaus p der residualen Aktivitäten mittels *one-way* ANOVA mit Dunett's post test gegenüber der links genannten Genotypen (Vergleich); ns = nicht signifikant

Zusammengefasst zeigte sich ein heterogenes Bild an residualen Aktivitäten bei MKD-Patienten, das sich aus einem Wechselspiel von unterschiedlichen Mutationen ableitet. Allgemein zeigten Patienten mit dem milderen HIDS eine höhere residuale Aktivität, als Patienten mit MA. Hervorzuheben ist hierbei, dass die Variante V377I auch in *Compound*-Heterozygotie mit schwerwiegenden Mutationen, nur mit HIDS assoziiert war. Das bedeutet, dass die Anwesenheit der Mutation V377I zu höherer residualer Aktivität und damit einem milderen Phänotyp führt.

## 5.4 Korrelation der experimentellen Ergebnisse mit dem klinischen Phänotyp

Wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, korreliert die residuale Aktivität in den Zellen von MKD-Patienten mit der Krankheitsschwere. Während die Aktivität im Falle des schwereren MA-Phänotyps im Median 0,2 % betrug, zeigte sich für den milderen HIDS-Phänotyp eine Aktivität von im Median 4,6 %. Um den Zusammenhang zwischen den Mutationen und dem resultierenden Phänotyp zu untersuchen, wurden die Ergebnisse zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung der Mevalonatkinase den Daten der MKD-Patienten gegenübergestellt (Abb. 15).

Alle neun untersuchten Varianten zeigten eine deutliche Beeinträchtigung der Stabilität oder Funktion in mindestens einer der 3 Kategorien. Während die Stabilität der nativen Proteinstruktur bei 6 von 9 Varianten (H20P, W188X, V261A, L264F, I268T und H380R) mittelgradig bis stark reduziert war, führten alle Mutationen zu einer mittelgradig bis starken Beeinträchtigung der thermodynamischen Stabilität. Die spezifische Aktivität des MVK-Dimers war für 4 Varianten (V203A, V261A, I268T und V377I) erhalten oder nur schwach beeinträchtigt. Klinisch sind die Mutationen W188X, V203A, V261A, V377I und H380R mit dem milderen HIDS-Phänotyp assoziiert, wobei nur für V377I ein homozygoter Genotyp und für alle anderen ein *compound* heterozygoter Genotyp vorlag. Die anderen 4 Varianten (H20P, L264F, I268T und A334T) sind mit dem MA-Phänotyp assoziiert und mit Ausnahme von A334T wurden alle im homozygoten Zustand bei MKD-Patienten gefunden.

Vergleicht man die Ergebnisse der biochemischen Experimente mit dem klinischen Phänotyp zeigten 3 von 4 MA- und 3 von 5 HIDS-Varianten eine mittlere bis schwere Beeinträchtigung der nativen Proteinstruktur. Die spezifische Funktion war bei 75 % der MA und 40 % der HIDS-Varianten mittelgradig bis stark reduziert. Bei der MA fand sich in jedem Fall eine schwere Beeinträchtigung in mindestens einer der Kategorien unabhängig davon, ob dies die Struktur oder die Funktion des Proteins betraf. Umgekehrt resultierten die zwei Varianten, die keine schwere Beeinträchtigung in allen drei Merkmalen aufwiesen (V203A, V377I) im milderen HIDS-Phänotyp. Drei Varianten mit schweren Einschränkungen (W188X, V261A und H380R) führten zum HIDS-Phänotyp, wobei die klinischen Daten nur für Patienten mit einem *compound* heterozygoten Genotyp vorlagen und der Einfluss des zweiten Allels in dieser Analyse nicht berücksichtigt werden konnte.



		Native Proteinstruktur	Thermodynamische Stabilität <sup>1</sup>	Spezifische Aktivität	Residuale Aktivität <sup>2</sup>	Phänotyp
	Wildtyp				100%	-
HIDS	W188X					HIDS <sup>3</sup>
	V203A					HIDS <sup>3</sup>
	V261A					HIDS <sup>3</sup>
	V377I				7,0 %	HIDS
	H380R					HIDS <sup>3</sup>
MA	H20P					MA
	L264F				0,0 %	MA
	I268T				0,17 %	MA
	A334T				0,30 %	MA

	cMVK stabil	$\Delta T_m < 1^\circ\text{C}$	Aktivität > 50%	Aktivität > 10%
	fMVK stabil	$\Delta T_m 1 - 5^\circ\text{C}$	Aktivität 5 - 50%	Aktivität 2 - 10%
	kein stabiles Dimer nachweisbar	$\Delta T_m > 5^\circ\text{C}$	Aktivität < 5%	Aktivität < 2%

<sup>1</sup> Für W188X, L264F und H380R keine Werte verfügbar, da kein stabiles Dimer aufgereinigt werden konnte

<sup>2</sup> Nur residuale Aktivitäten von Patienten mit homozygotem Phänotyp wurden berücksichtigt

<sup>3</sup> Phänotyp des *compound* heterozygoten Genotyps mit einer zweiten Mutation

MA = Mevalonazidurie; HIDS = Hyper-Immunglobulin D-Syndrom

### Abbildung 15. Übersicht über die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der varianten Mevalonatkinase Proteine

Dargestellt sind die Ergebnisse der Charakterisierung der nativen Proteinstruktur, der thermodynamischen Stabilität und der spezifischen Aktivität für den MVK-Wildtyp und die neun untersuchten Varianten. Die Schwere der Beeinträchtigung ist farblich hervorgehoben von schwach/keine (grün) über mittel (gelb) bis stark (orange). Als Maß diente für die native Proteinstruktur die Stabilität nach Proteinaufreinigung als Fusions- oder geschnittenes Protein und für die thermodynamische Stabilität die Verschiebung des  $T_m$  im DSF-Experiment.

Zusammenfassend zeigt sich, dass MA-Varianten schwerere strukturelle und funktionelle Störungen aufweisen als HIDS-Varianten. Mutationen, die keine schwere Beeinträchtigung zeigten, waren ausschließlich mit dem HIDS-Phänotyp assoziiert. Allerdings sind auch Varianten mit schweren Einschränkungen mit dem milderen Phänotyp assoziiert. Dass in allen drei Fällen ein *compound* heterozygoter Genotyp vorlag, betont die Notwendigkeit, bei der Korrelation zwischen biochemischem und klinischem Phänotyp den Einfluss beider Allele des Genotyps zu berücksichtigen. Insgesamt gilt, dass für die volle Funktion in der Zelle sowohl die Proteinstruktur als auch die Funktionalität gewährleistet sein müssen.

## 6 Diskussion

### 6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Experimente dieser Studie zeigen erstmals die strukturellen und funktionellen Auswirkungen von neun verschiedenen Mutationen auf das MVK-Protein. Alle varianten MVK-Proteine wurden in Bezug auf drei verschiedene Dimensionen untersucht. Es erfolgte (I) die Untersuchung der Oligomerisierung und Aggregation des nativ gefalteten Proteins, (II) die Analyse der Auswirkungen von thermischem Stress auf die Stabilität und das Aggregationsverhalten der Proteine und (III) die Untersuchung der spezifischen Aktivität des rekombinanten Proteins. Anschließend wurden im letzten Schritt (IV) die Erkenntnisse, die am aufgereinigten MVK-Protein gewonnen wurden, mit der residualen Aktivität aus MKD-Patientenzellen verglichen.

Bei der Untersuchung der nativen Struktur zeigte sich das MVK-Wildtyp Protein in Lösung als Dimer und es ließen sich keine Monomere nachweisen. Mutationen im *MVK*-Gen führten zur Störung der Oligomerisierung. Während die Mutationen W188X, L264F und H380R zum vollständigen Verlust mit teils deutlich gesteigerter Aggregation des Proteins führten, ließen sich für die anderen Varianten MVK-Dimere nachweisen. Im Gegensatz zum Wildtyp waren die Varianten H20P, I268T und V261A deutlich instabiler und benötigten den stabilisierenden Effekt des MBP. V203A, A334T und V377I hingegen zeigten eine Stabilität des nativen Proteins vergleichbar mit der des Wildtyps. Allerdings ließ sich für alle sechs Varianten bereits im nativen Zustand eine erhöhte Hydrophobizität nachweisen.

Die thermodynamische Stabilität war für alle untersuchten Varianten reduziert. Die Mutationen H20P, I268T und V261A führten zu einer sehr geringen thermischen Stabilität. Im Gegensatz hierzu zeigten die Varianten V203A, A334T und V377I eine fast normale thermische Stabilität, sowie ein mit dem Wildtyp vergleichbares Aggregationsverhalten. Bei der kinetischen Untersuchung wurde jedoch für alle drei Varianten eine deutlich geringere Aktivierungsenergie für die Induktion der Entfaltung benötigt.

Bei der funktionellen Charakterisierung der aufgereinigten Varianten ließen sich zwei Gruppen unterscheiden. Während H20P, W188X, L264F, A334T und H380R eine minimale

bis keine spezifische Aktivität aufwiesen, wurde für die Varianten V203A, V261A, I268T und V377I eine Aktivität zwischen 50 und 100 % im Vergleich zum Wildtyp gemessen.

Die Auswertung der residualen Aktivitäten aus Patientenzellen ergab eine insgesamt deutlich erniedrigte Aktivität von im Median 3,6 % im Vergleich zu Gesunden. Patienten mit dem HIDS-Phänotyp (Median 4,6 %) wiesen eine deutliche höhere residuale Aktivität als MA-Patienten (Median 0,2 %) auf.

Beim Vergleich der experimentell gewonnenen Ergebnisse mit den Daten von MKD-Patienten zeigte sich, dass Varianten, die mit einem schweren MA-Phänotyp assoziiert sind, eine stärkere Beeinträchtigung der Struktur und Funktion aufwiesen als Varianten, die mit dem milderen HIDS-Phänotyp verknüpft sind.

Zusammengefasst zeigten die untersuchten Varianten eine unterschiedlich starke Beeinträchtigung der nativen Struktur und der thermodynamischen Stabilität. Die spezifische Aktivität der varianten Proteine war teilweise erhalten. Im Patientenzellen hingegen war die residuale Aktivität stark erniedrigt abhängig vom jeweiligen Genotyp. In der Zusammenschau der Ergebnisse zeigt sich, dass sowohl eine Beeinträchtigung der Proteinstabilität als auch der katalytischen Enzymfunktion die Mevalonatkinase-Defizienz hervorrufen können.

## 6.2 Angeborene Stoffwechselerkrankungen und Proteinefehlfaltung

Wie einleitend beschrieben können durch Mutationen verursachte Störungen in der Proteinhomöostase die Physiologie der Zelle nachhaltig beeinflussen und auf diese Weise zu Krankheit führen. Hierbei wird zwischen *gain-of-function* (Funktionszugewinn) und *loss-of-function* (Funktionsverlust) unterschieden.

Speziell im Bereich der angeborenen Stoffwechselerkrankungen, zumeist hervorgerufen durch Mutationen in einem einzelnen Gen, gewinnt die Proteinefehlfaltung als pathophysiologischer Mechanismus an Bedeutung (Muntau, Leandro et al. 2014). In der Regel führen die Mutationen zum Austausch einzelner Aminosäuren (*missense* Mutation) in einem komplexen, aus mehreren Hundert Aminosäuren bestehenden Protein. Die varianten Proteine zeigen eine starke Beeinträchtigung der Faltung und Stabilität im nativen Zustand sowie eine reduzierte thermodynamische Stabilität, die in Konsequenz zum Funktionsverlust (*loss-of-function*) des Proteins führen (Muntau and Gersting 2010). Dieser Pathomechanismus wurde für die Phenylketonurie (PKU; *Online mendelian inheritance in man* #261600), sowie die Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz (MCADD; *Online mendelian inheritance in man* #201450) detailliert beschrieben (Gersting, Kemter et al. 2008, Maier, Gersting et al. 2009). Neben den angeborenen Stoffwechselerkrankungen spielt die Proteinefehlfaltung auch bei der Pathogenese von hereditären Fiebersyndromen eine Rolle. Beispielsweise kommt es beim Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1-assoziiertem periodischen Syndrom (TRAPS) zum *gain-of-function*, indem die Akkumulation von fehlgefaltetem TNFRSF1A-Protein zur Aktivierung des Immunsystems führt (Todd, Radford et al. 2004, Lobito, Kimberley et al. 2006).

## 6.3 Mutationen führen zur Beeinträchtigung der nativen Proteinstruktur

Im Falle der MCADD führen Mutationen im *ACADM*-Gen zum *loss-of-function* des MCAD-Proteins (Maier, Gersting et al. 2009). Das MCAD-Protein ist im Mitochondrium lokalisiert und bildet in wässriger Lösung ein Tetramer (Ikeda, Okamura-Ikeda et al. 1985). Bei den krankheitsverursachenden Mutationen handelt es sich größtenteils um *missense* Mutationen, die zur Destabilisierung des Proteins und in Konsequenz zum Funktionsverlust führen (Maier, Gersting et al. 2009). Hierbei bewirkt der Austausch einzelner Aminosäuren

in verschiedenen Domänen des MCAD-Proteins eine Beeinträchtigung der nativen Struktur des rekombinanten Proteins. Gemäß der Studie von Maier et al. (Maier, Gersting et al. 2009) konnten die Varianten anhand ihrer Oligomerisierungsprofile in drei Gruppen eingeteilt werden: (1) Vergleichbar mit dem Wildtyp, (2) Fehlen von Tetrameren und anderen Oligomeren sowie verstärkte Aggregation, (3) verschiedene Proteinfragmente. Darüber hinaus konnten keinerlei Dimere oder Monomere für die Varianten beobachtet werden. Zusätzlich haben die varianten MCAD-Proteine bereits im nativen Zustand eine deutliche erhöhte Hydrophobizität aufgezeigt (Jank, Maier et al. 2014).

Auch die MKD wird vorwiegend durch *missense* Mutationen verursacht, die sich über das gesamte *MVK*-Gen verteilen und nicht auf eine spezifische Domäne beschränkt sind (Abb. 2). Weiterhin ist bekannt, dass Zellen von MKD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger *MVK*-Protein enthalten (Hinson, Ross et al. 1999). Die Auswirkungen von Mutationen auf die native Proteinstruktur wurden jedoch bisher nicht untersucht. Die Untersuchungen dieser Arbeit bestätigt, dass das *MVK*-Protein bildet in wässriger Lösung ein Homodimer bildet, wie in der Literatur berichtet (Fu, Wang et al. 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die neun varianten Proteine nach Aufreinigung aus *E. coli*, wie auch für MCADD von Maier et al. beschrieben, zu verminderter Stabilität mit teilweise vermehrter Aggregation führen, und sich wie bei MCADD gruppieren lassen (Maier, Gersting et al. 2009). Während die Varianten H20P, V203A, V261A, I268T, A334T und V377I ein Oligomerisierungsprofil vergleichbar zum Wildtyp aufwiesen (Gruppe 1), ließen sich für die Varianten W188X, L264F und H380R keine Dimere, sondern ausschließlich Aggregate nachweisen (Gruppe 2). Es konnten jedoch keine Varianten, die nur Proteinfragmente beinhalteten und Gruppe 3 entsprechen, beobachtet werden. Weiterhin zeigten sich auch für die *MVK* nur Dimere und keine anderen Oligomere oder Monomere.

Eine erhöhte Hydrophobizität deutet auf eine verminderte konformationelle Stabilität hin. Normalerweise befinden sich hydrophobe Aminosäureketten im Inneren und nicht an der Oberfläche des Proteins. Charakteristisch für teilweise entfaltete sowie fehlgefaltete Proteine ist die Exposition von hydrophoben Aminosäureketten auf deren Oberfläche (Kim, Hipp et al. 2013), was sich in einer erhöhten Hydrophobizität im Grundzustand äußert. Wie zuvor auch für die varianten MCAD-Proteine von Jank et al. beschrieben (Jank, Maier et al. 2014), konnte auch die varianten *MVK*-Proteine eine deutlich erhöhte Hydrophobizität im nativen Zustand nachgewiesen werden.

## 6.4 Variante Proteine zeigen eine verringerte thermodynamische Stabilität

Für Proteinfaltungserkrankungen ist eine höhere Anfälligkeit gegenüber thermischem Stress neben der Störung der Stabilität des nativen Zustands charakteristisch (Muntau and Gersting 2010). Normalerweise weist ein Protein seinen energetisch günstigsten Zustand in der korrekt gefalteten, nativen Konformation auf (Anfinsen 1973). Neuere Studien legen nahe, dass sich Proteine in einem Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Stadien von ungefaltet über Zwischenzustände bis hin zum vollständig gefalteten Protein befinden. Mutationen können zu einer Störung dieses Gleichgewichts führen, bei dem sich weniger Proteine in die idealtypische Konformation falten und einen insgesamt höheren energetischen Zustand aufweisen (Powers, Morimoto et al. 2009). Folglich reicht bereits eine geringere Energie aus, um das Gleichgewicht Richtung Entfaltung zu verschieben.

Dies konnte beispielsweise für die PKU und für die MCADD gezeigt werden. Hierzu wurden in beiden Fällen variante PAH- beziehungsweise MCAD-Proteine aus *E. coli* aufgereinigt, die thermische Stabilität der varianten Proteine mittels *dynamic scanning fluorimetry* (DSF) untersucht und anschließend mit dem Wildtyp verglichen. Sowohl im Falle der PKU (Gersting, Kemter et al. 2008), als auch der MCADD (Maier, Gersting et al. 2009) konnte eine Linksverschiebung der Kurven, also eine Entfaltung bei niedrigeren Temperaturen, beobachtet werden. Die Ausprägung der Linksverschiebung ist abhängig von der Variante und kann durch die Bestimmung des *transition midpoints*  $T_m$  quantifiziert werden. Die varianten Proteine zeigten eine Abweichung des  $T_m$  zwischen 0,9 und 2,1 °C bei der PKU und 2,5 und 12,6 °C bei der MCADD. Weiterhin konnte für die MCAD-Varianten eine verstärkte Aggregation mittels *right angle light scattering* (RALS), sowie eine teilweise deutlich verminderte Aktivierungsenergie für die Entfaltung nachgewiesen werden (Jank, Maier et al. 2014).

Auch für die MKD gibt es bereits indirekte Hinweise auf eine erniedrigte thermodynamische Stabilität. Die Enzymfunktion von Patientenzellen korreliert *ex vivo* invers mit der Temperatur, sodass Temperaturerhöhungen zu einer Abnahme und eine Temperaturreduktion zu einer Zunahme der residualen Aktivität in Patientenzellen führt (Houten, Frenkel et al. 2002, Mandey, Schneiders et al. 2006). Dies korreliert in den meisten Fällen mit der mittels Western Blot gemessenen Proteinmenge. Jedoch kann nicht in allen Fällen eine Erhöhung der residualen Aktivität mittels Temperaturniedrigung erreicht werden. Dies ist vor allem bei

Patienten der Fall, die am schwereren MA-Phänotyp erkrankt sind. Weiterhin ist eine Differenzierung zwischen den einzelnen Mutationen eines Genotyps nicht möglich. Die DSF-Experimente der vorliegenden Arbeit zeigten analog zu den Ergebnissen für die PKU und die MCADD eine deutliche frühere Entfaltung der varianten MVK-Proteine. Die  $T_m$  lagen im Vergleich zum Wildtyp zwischen 1,5 und 11,4 °C niedriger und damit in einem ähnlichen Bereich wie bei Gersting et al. (Gersting, Kemter et al. 2008) und Maier et al. (Maier, Gersting et al. 2009). Auch die Aktivierungsenergie, die für die Entfaltung benötigt wird, war für die varianten MVK-Proteine deutlich reduziert. Im Gegensatz zu den MCAD-Varianten zeigten die untersuchten MVK-Varianten jedoch keine signifikanten Unterschiede im Aggregationsverhalten.

## 6.5 Mutationen führen zur funktionelle Beeinträchtigung

Neben strukturellen Einflüssen können *missense* Mutationen auch primär Auswirkungen auf die funktionellen Eigenschaften des Proteins haben. Bei den meisten angeborenen Stoffwechselerkrankungen kommt es zu einem *loss-of-function* eines bestimmten Enzyms (Muntau and Gersting 2010). Grundsätzlich lassen sich residuale und spezifische Aktivität eines Enzyms unterscheiden. Als spezifische Aktivität wird der Umsatz von Substrat im Verhältnis zur Proteinmenge bezeichnet und dient der Charakterisierung des varianten Proteins, um Einblick in den Pathomechanismus zu erhalten. Die residuale Aktivität bezieht sich bei Stoffwechselerkrankungen meist auf die den Substratumsatz im Verhältnis zur Zellzahl (Waters 2003).

Sowohl bei der PKU wie bei der MCADD zeigen die aus *E. coli* aufgereinigten varianten Proteine sehr variable spezifische Aktivitäten, die im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp zwischen 0 und >100 % liegen, jedoch klassischerweise deutlich erniedrigt sind (Maier, Gersting et al. 2009, Jank, Maier et al. 2014, Blau 2016). Ähnliches wurde für die MKD berichtet, wobei bisher deutlich weniger Mutationen *in vitro* untersucht wurden. Für die Variante A334T konnte im Vergleich zum MVK-Wildtyp als rekombinantes Protein eine Aktivität zwischen 0 und 2 %, für H20P keine relevante Aktivität, für I268T 5-19 % und für V377I 35 % nachgewiesen werden (Hinson, Ross et al. 1999, Houten, Kuis et al. 1999). Am besten untersucht ist die Variante A334T. A334 ist Teil der Substratbindestelle und bei Mutation an dieser Position kommt es zu einer schwächeren Substratbindung mit konsequentem Funktionsverlust (Hinson, Chambliss et al. 1997). Im Vergleich sind die in

dieser Studie erhobenen Befunde ähnlich. Die Enzymaktivitäten waren jedoch für I268T und V377I deutlich höher. Die Unterschiede könnten dadurch bedingt sein, dass die in der Literatur beschriebenen Messungen zwar auf MVK-Proteinmenge normalisiert waren, die varianten Proteine jedoch nicht mittels SEC aufgetrennt wurden. Somit beinhaltet das untersuchte Protein auch nicht funktionelle Aggregate und Degradationsprodukte. Die hier verwendete Methodik bietet den Vorteil, dass sich einerseits auch niedrige Aktivitäten nachweisen lassen und andererseits eine klare Unterscheidung zwischen dem Verlust der katalytischen Eigenschaften und dem Proteinverlust aufgrund von Instabilität möglich ist.

Im Gegensatz zur spezifischen Aktivität bezieht sich die residuale Aktivität auf den Substratumsatz im Verhältnis zur Menge an Zellen. Sie setzt sich folglich aus dem Anteil des untersuchten Enzyms an der Gesamtproteinmenge sowie der spezifischen Aktivität des jeweiligen varianten Proteins zusammen. Die residuale Aktivität in Zellen determiniert in der Regel entscheidend die Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp. Bei der MKD korreliert der Phänotyp mit der residualen Aktivität der MVK, die sich in Fibroblasten oder PBMC von Patienten mittels Enzymassay bestimmen lässt. Während diese für den MA-Phänotyp  $< 0,5\%$  ist, variiert sie bei HIDS zwischen 1 und 7 % (Houten, Wanders et al. 2000). Dies konnte durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden, die eine residuale Aktivität für die MA von im Median 0,2 % (IQR 0 bis 0,6 %) und für HIDS von 4,6 % (IQR 2,1 bis 7,3 %) ergab.

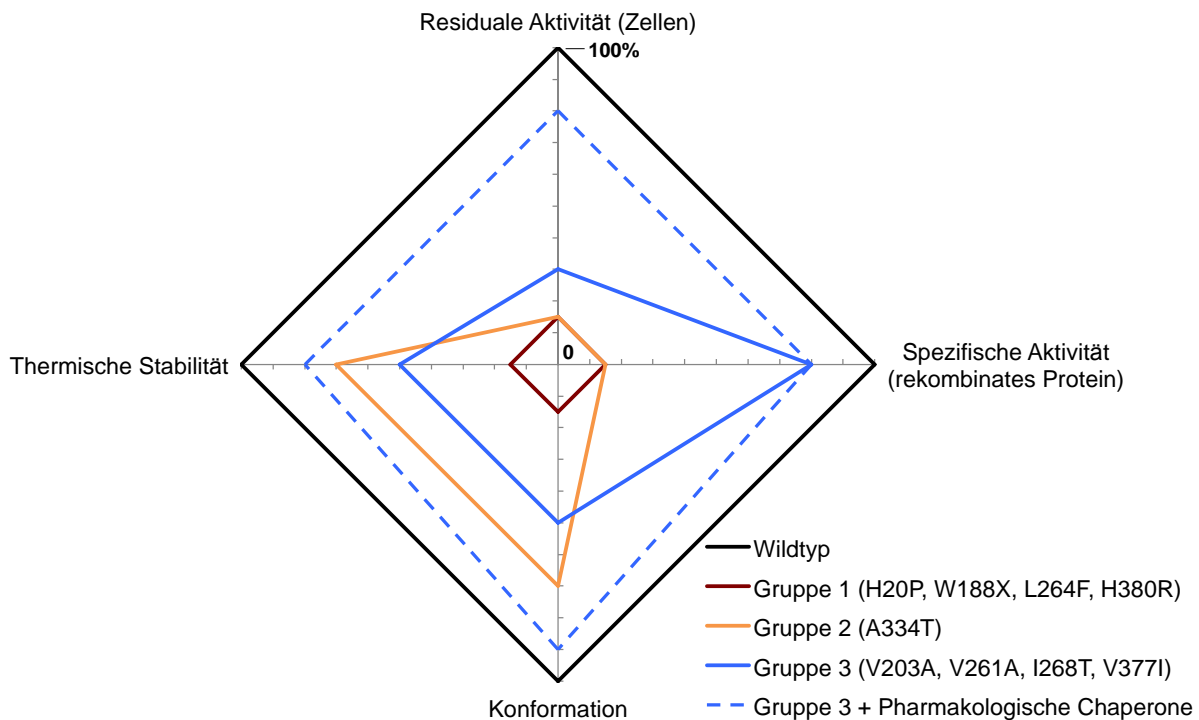
Vergleicht man spezifische und residuale Aktivität, ergibt sich für die meisten Varianten eine deutliche Diskrepanz. Da sich die residuale Enzymaktivität aus zwei Komponenten, der spezifischen Aktivität und dem Anteil der funktionellen MVK an der Gesamtproteinmenge zusammensetzt, deutet dies darauf hin, dass die Proteinmenge der funktionellen MVK im Falle der MKD deutlich erniedrigt ist. In Zusammenschau mit den vorherigen Daten unterstützt diese Beobachtung die Relevanz der Proteinefehlfaltung für die Pathogenese der MKD. Gleichzeitig deuten die Unterschiede in der spezifischen und residualen Aktivität der einzelnen Varianten auf eine unterschiedliche Pathophysiologie in Abhängigkeit der jeweiligen Mutation hin.



## 6.6 Neue Erkenntnisse zur mutationsspezifischen Pathophysiologie ermöglichen eine detaillierte Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation erweist sich bei angeborenen Stoffwechselerkrankungen meist als komplex und die Auswirkungen von Mutationen lassen sich nicht immer einfach vorhersagen. Bei der PKU sind über 950 Mutationen im *PAH*-Gen bekannt, die zu unterschiedlichen Phänotypen führen (Blau 2016). Zur Unterscheidung des Phänotyps kommt der Phenylalaninkonzentration im Blut der Patienten eine zentrale Bedeutung zu, da diese die Akkumulation des Substrates der PAH im Organismus widerspiegelt. Allerdings liefert die Phenylalaninkonzentration keine Aussage zum Mechanismus, der zum *loss-of-function* führt. Nähergehende Untersuchungen der varianten Proteine *in vitro* konnten die Relevanz von Proteinfehlfaltung für die Pathogenese der Erkrankung zeigen (Gersting, Kemter et al. 2008). Aufbauend auf diesen Kenntnissen konnte ein computergestütztes Modell zur Vorhersage des Phänotyps anhand des Genotyps erstellt werden (Wettstein, Underhaug et al. 2015). Dies hebt die Bedeutung der *in vitro* gewonnenen Daten für das Verständnis der Pathophysiologie hervor.

Bei der MKD gestaltet sich die Genotyp-Phänotyp-Korrelation ähnlich komplex. Es sind mehr als 100 Mutationen bekannt, wobei viele Patienten *compound* heterozygot sind (van der Hilst, Bodar et al. 2008). Neben dem Biomarker der MVA-Exkretion, die die Akkumulation des MVK-Substrats widerspiegelt (Jeyaratnam, Ter Haar et al. 2016), zeigt die residuale MVK-Aktivität in Patientenzellen eine gute Korrelation mit dem klinischen Phänotyp (Houten, Wanders et al. 2000). Anhand der in dieser Studie erhobenen Daten zur strukturellen und funktionellen Auswirkung von neun Mutationen auf das MVK-Protein konnte erstmals die Pathophysiologie des *loss-of-function* bei MKD beschrieben werden. Unter Einbezug der klinischen Daten können drei verschiedene mutationsspezifische Mechanismen unterschieden werden (Abb. 16).



**Abbildung 16.** Strukturelle und funktionelle Auswirkungen von Mutationen auf das Mevalonatkinase-Protein

Schematische Darstellung der Konformation, thermischen Stabilität, spezifischen und residualen Aktivität der gruppierten varianten MVK-Proteine im Vergleich zum MVK-Wildtyp (schwarz). Die drei Gruppen stellen unterschiedliche Pathomechanismen dar, die zum *loss-of-function* führen. Gruppe 3 (blau) eignet sich zur Therapie mit pharmakologischen Chaperonen (blau gestrichelt).

### 6.6.1 *Loss-of-function* aufgrund starker struktureller Beeinträchtigung (Gruppe 1)

Die erste Gruppe umfasst die Varianten H20P, W188X, L264F und H380R. Alle Varianten führen zu einer schweren Beeinträchtigung der nativen Struktur des MVK-Proteins. Nur H20P war als Fusionsprotein stabil, zeigte jedoch eine stark reduzierte thermische Stabilität. Bei gleichzeitig geringer oder nicht nachweisbarer spezifischer Aktivität lässt dies auf einen schweren Faltungsdefekt dieser Varianten schließen, infolgedessen kein funktionelles Protein mehr vorhanden ist. Da im Falle von H20P auch die mögliche Bindestelle des Substrates betroffen ist (Abb. 6C), kann nicht ausgeschlossen werden, dass der *loss-of-function* nicht nur durch die konformationelle Instabilität, sondern auch durch die Beeinträchtigung der katalytischen Funktion hervorgerufen wird.

Klinisch sind L264F und H20P mit dem schwereren MA-Phänotyp verknüpft und weisen eine sehr niedrige residuale Aktivität auf (Houten, Romeijn et al. 1999, Houten, Koster et al.

2001, Mandey, Schneiders et al. 2006). W188X und H380R wurden nur in *compound* heterozygotem Zustand beschrieben und sind mit dem HIDS-Phänotyp assoziiert (Stojanov, Lohse et al. 2004, Tahara, Sakai et al. 2011). Sowohl für W188X als auch H380R wäre aufgrund der experimentellen Ergebnisse ein schwerer Phänotyp zu erwarten gewesen. Dies lässt zum einen darauf schließen, dass eine Homozygotie, besonders von W188X, möglicherweise nicht mit dem Leben vereinbar ist, und zum anderen, dass das zweite Allel (hier V377I) bei einer schweren Mutation wie W188X maßgeblichen Einfluss auf den Phänotyp hat. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass sowohl L264F als auch H20P, die in homozygotem Zustand mit dem MA-Phänotyp assoziiert sind, bei *Compound*-Heterozygotie mit V377I zum HIDS-Phänotyp mit deutlich höheren residualen Aktivitäten führen (Mandey, Schneiders et al. 2006).

Zusammengenommen konnte für die vier Varianten H20P, W188X, L264F und H380R eine deutliche Beeinträchtigung bereits im nativen Zustand mit vollständigem Verlust des Proteins und in Konsequenz der Funktion beobachtet werden. Klinisch führt dies im Fall von Homozygotie zu einem schwerwiegenden MA-Phänotyp. Bei *compound* heterozygoten Patienten kann der Phänotyp in Abhängigkeit der zweiten Mutation mild ausfallen, wie beispielsweise beim Genotyp W188X/V377I.

### **6.6.2 *Loss-of-function* aufgrund eingeschränkter katalytischer Aktivität (Gruppe 2)**

Für die Variante A334T konnte ein zweiter Mechanismus nachgewiesen werden. Der Austausch des Alanins an Position 334, das an der Bindung des Substrats beteiligt ist, durch ein Threonin resultiert in einer deutlichen Abnahme der Affinität zum Substrat und einem Verlust der katalytischen Funktion (Fu, Wang et al. 2002). Diese Beobachtung wurde von den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt und es wurde eine spezifische Aktivität von 3,1 % gemessen. Die konformationelle Stabilität war nur geringgradig beeinträchtigt und die Variante zeigte sich im nativen Zustand und bei thermischem Stress verhältnismäßig stabil. Klinisch ist die Mutation mit der MA verknüpft und zeigt sehr niedrige residuale Aktivitäten (Hinson, Chambliss et al. 1997, Prietsch, Mayatepek et al. 2003). Der *loss-of-function* lässt sich in diesem Fall primär auf den Verlust der katalytischen Eigenschaften und nur sekundär auf ein strukturelles Problem zurückführen.

### 6.6.3 *Loss-of-function* aufgrund eingeschränkter konformationeller Stabilität bei Erhalt der funktionellen Enzymaktivität (Gruppe 3)

Die dritte Gruppe von Mutationen bilden die Varianten V203A, V261A, I268T und V377I. Hierbei kommt es zu Austausch von strukturell ähnlichen Aminosäuren. Alle vier Varianten zeigten sich in der nativen Struktur als Dimer, wobei V203A und V377I eine deutlich höhere konformationelle sowie thermische Stabilität als V261A und I268T aufwiesen. Jedoch ergab die kinetische Untersuchung für V203A und V377I eine deutliche Erniedrigung der Aktivierungsenergie verglichen zum Wildtyp. Im Gegensatz zu den anderen Varianten zeigten alle vier eine spezifische Aktivität von 50 bis 100 % im Vergleich zum Wildtyp.

Klinisch sind alle vier Mutationen mit dem milderen HIDS verknüpft, wobei I268T zusätzlich auch bei der MA vorkommt. Homozygotie für I268T führt zur MA (Houten, Koster et al. 2001), während ein *compound* heterozygoter Zustand mit V203A (Stojanov, Lohse et al. 2004) oder V377I zu HIDS mit deutlich höherer residualer Aktivität führt (Cuisset, Drenth et al. 2001). V377I stellt die häufigste Mutation bei MKD dar und ist nur mit HIDS assoziiert. Homozygote Träger der Mutation V377I zeigen die höchsten residualen Enzymaktivitäten und haben teilweise einen nur schwach ausgeprägten Phänotyp (Messer, Alsaleh et al. 2016). Bei *compound* heterozygoten Patienten, die auf einem Allel die Mutation V377I tragen, kommt es unabhängig vom zweiten Allel zu einem milderen HIDS-Phänotyp, auch wenn die zweite Mutation normalerweise mit MA verknüpft ist. Somit schützt V377I die Patienten vor einem schwerwiegenden Phänotyp.

Alle vier Varianten (V203A, V261A, I268T und V377I) zeigen die typischen Merkmale der Proteinefehlfaltung. Die konformationelle Stabilität des nativen Zustands ist reduziert und die Thermolabilität deutlich erhöht. Dies führt über eine Reduktion der Proteinmenge zu einer Reduktion der residualen Aktivität in Patientenzellen. Im Gegensatz zur ersten Gruppe verfügen diese Varianten jedoch über eine deutlich höhere spezifische Aktivität, die zu einer höheren residualen Aktivität und folglich zu einem milderen Phänotyp führt. Der *loss-of-function* ist damit durch einen signifikanten Proteinverlust aufgrund verminderter struktureller Stabilität bedingt, der durch thermischen Stress weiter verstärkt wird.

Zusammenfassend führt Proteinefehlfaltung für alle untersuchten Varianten mit Ausnahme von A334T zum Proteinverlust und in Konsequenz zum *loss-of-function* der MVK. Die

Ausprägung des Phänotyps korreliert hierbei sowohl mit der konformationellen Stabilität des Proteins als auch mit der spezifischen Aktivität. Weiterhin ist für den Phänotyp die Zusammensetzung des Genotyps bei *compound* heterozygoten Patienten von hoher Bedeutung. Beispielsweise führt der Genotyp, der auf einem Allel die Mutation V377I aufwies unabhängig vom zweiten Allel immer zu einem milden Phänotyp. Zur weiteren Erhärtung der Proteinefehlfaltungshypothese bei MKD und deren Relevanz sollten im Folgenden weitere Mutationen untersucht, sowie analog zur PKU und MCADD detailliertere Experimente in eukaryoten Zellen durchgeführt werden (Jank, Maier et al. 2014, Danecka, Woidy et al. 2015).

#### **6.6.4 Modifikation der Genotyp-Phänotyp-Korrelation durch interallelische Komplementation**

Die *in vitro* gesammelten Daten zur PKU bilden in Zusammenschau mit der Dokumentation der Genotypen und klinischen Phänotypen in einer Datenbank die Voraussetzung für die computergestützte Vorhersage des Phänotyps anhand des Genotyps (Wettstein, Underhaug et al. 2015). Dies erweist sich besonders bei schwerwiegenden Genotypen als präzise, jedoch ist die Bestimmung der Auswirkungen von *compound* heterozygoten Genotypen auch mit dieser Methode schwierig. Dies liegt einerseits an der fehlenden Berücksichtigung des Zellmilieus, das *in vivo* vorliegt, andererseits an der Nichtbeachtung des Phänomens der interallelischen Komplementation (Waters 2003).

Bei der interallelischen Komplementation handelt es sich um einen Effekt, der bei Mutationen in multimeren Proteinen auftritt und die Funktion beeinflusst. Beispielsweise stellt das funktionelle PAH-Protein ein Tetramer dar und besteht aus vier PAH-Monomeren (Arturo, Gupta et al. 2016). Da der Großteil der Patienten *compound* heterozygot ist (Blau 2016) und zwei unterschiedliche *PAH*-Allele trägt, kommt es in ihren Zellen zur Expression und Translation zweier unterschiedlicher PAH-Monomere. Die Stabilität des Tetramers kann durch die Komposition der Monomere beeinflusst werden. Diese interallelische Komplementation kann den Funktionsverlust des Proteins entweder verstärken (negative) oder abschwächen (positive Komplementation) (Crick and Orgel 1964). Eine negative interallelische Komplementation führt zu einer residualen Aktivität, die unterhalb des Mittelwerts der für beide Mutationen im homozygoten Zustand erwarteten Aktivität liegt.

Umgekehrt ist die residuale Aktivität bei positiver interallelischer Komplementation höher, als es sich theoretisch erwartet. Dies konnte experimentell durch die Koexpression zweier varianter PAH-Monomere gezeigt werden. Hierbei kam es zur Bildung unterschiedlicher PAH-Tetramere, die sich in der Zusammensetzung der Monomere unterscheiden. Die funktionelle Überprüfung dieser PAH-Tetramere ergab eine niedrigere Aktivität als die vorhergesagte Aktivität aus den Mittelwerten (negative interallelische Komplementation) (Leandro, Nascimento et al. 2006). Umgekehrt konnte in einer weiteren Studie für ausgewählte Genotypen eine positive interallelische Komplementation festgestellt werden (Shen, Heintz et al. 2016).

Da bei der MKD analog zur PKU die Großzahl an Patienten *compound* heterozygot ist (van der Hilst, Bodar et al. 2008) und die MVK auch ein multimeres Protein darstellt, besteht auch hier die Möglichkeit der interallelischen Komplementation. Bei genauerer Analyse zeigten MKD-Patienten mit dem *compound* heterozygoten Genotyp I268T/V377I eine residuale Aktivität, die über dem Mittelwert der beiden Aktivitäten homozygoter Träger lag (Tabelle 11). Dies entspräche einer positiven interallelischen Komplementation. Umgekehrt führte die Mutation H20P zu deutlich niedrigeren residualen Aktivitäten, als sich aus den Daten der anderen Genotypen erwarten ließe, was auf eine negative interallelische Komplementation hindeutet.

Speziell bei multimeren Proteinen, die von Fehlfaltung betroffen sind, ist die Hypothese der interallelischen Komplementation interessant. Bereits die Aufreinigung der MVK zeigte, dass bestimmte variante Proteine nur bei Präsenz von MBP ein stabiles Dimer bildeten. Es erscheint plausibel, dass ein MVK-Heterodimer AB, bestehend aus einem normalerweise instabilen Monomer A und einem zweiten deutlich stabileren Monomer B, insgesamt stabil wäre. Wenn nun Monomer A eine erhaltene spezifische Aktivität aufweist, könnte dies zu einer insgesamt höheren residualen Aktivität führen als theoretisch angenommen (positive interallelische Komplementation). Umgekehrt könnte ein Monomer A ohne spezifische Aktivität ein Monomer B binden und ein Heterodimer AB bilden, das keine Aktivität besitzt und somit die residuale Aktivität vermindern (negative interallelische Komplementation). Zur genaueren Bewertung dieses Phänomens bedarf es weiterer Experimente, die ähnlich wie im vorhergenannten Koexpressionsmodell (Shen, Heintz et al. 2016) die Enzymaktivität in Abhängigkeit der Dimerkomposition untersuchen.

## 6.7 Konsequenzen für die pharmakologische Therapie

### 6.7.1 Entwicklung von pharmakologischen Chaperonen

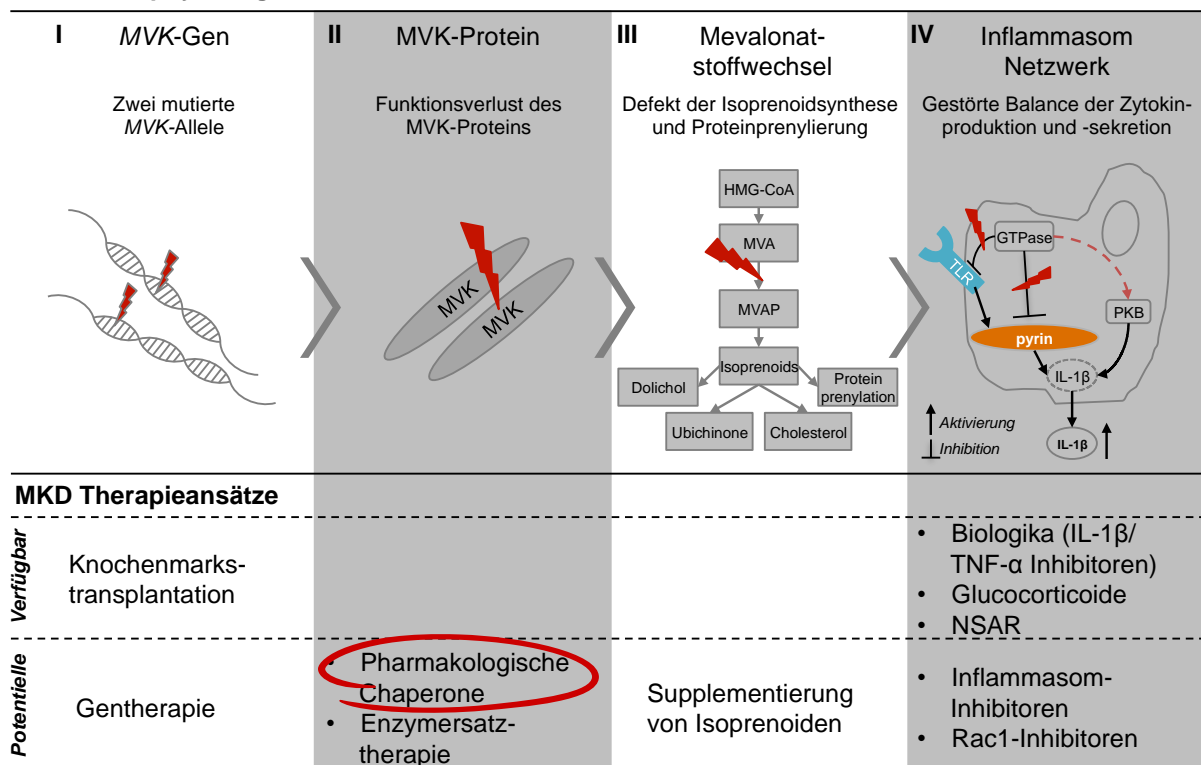
Wie vorangehend dargestellt, benötigen die meisten Proteine zur Ausübung ihrer Funktion die Faltung in eine klar definierte dreidimensionale Struktur (native Struktur). Bei kleineren Proteinen kann dieser Faltungsprozess oft spontan stattfinden. Größere und komplexere Proteine hingegen zeigen eine geringere Faltungseffizienz und sind anfälliger für Fehlfaltung und Aggregation, vor allem da dies durch eine Umgebung mit vielen anderen Proteinen erschwert wird (Ellis and Minton 2006). Zur Aufrechterhaltung der Integrität der Proteinhomöostase (Proteostase) existiert in der Zelle ein komplexes Netzwerk für die Qualitätskontrolle, das unter anderem molekulare Chaperone beinhaltet (Balchin, Hayer-Hartl et al. 2016). Diese Chaperone sind Proteine, die mit anderen Proteinen interagieren und den Faltungsprozess unterstützen, jedoch nicht Teil der finalen und funktionellen Proteinstruktur sind (Kim, Hipp et al. 2013). Bei Proteinfaltungserkrankungen, wie beispielsweise der PKU, kommt es zum *loss-of-function* von einzelnen Proteinen, die die Proteostase aus dem Gleichgewicht bringen und nicht vom Qualitätskontrollnetzwerk ausgeglichen werden können (Powers, Morimoto et al. 2009). Neuere Therapiekonzepte versuchen nun, die Aufgabe des Qualitätsnetzwerks nachzuahmen, indem stabilisierende Substanzen, sogenannte pharmakologische Chaperone, entwickelt werden, die die Proteostase wiederherstellen (Balch, Morimoto et al. 2008). Für die PKU ist der natürliche Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH4) des defekten Enzyms Phenylalaninhydroxylase in pharmakologischen Dosen als pharmakologisches Chaperon wirksam. Er wurde 2007 als *orphan drug* für die PKU zugelassen (Muntau, Röschinger et al. 2002). Entscheidend für den Erfolg war, responsive Genotypen zu identifizieren, da ähnlich wie bei der MKD nicht alle Mutationen dem gleichen Pathomechanismus folgen. Für die Wirksamkeit von pharmakologischen Chaperonen müssen die varianten Proteine translatiert werden, eine spezifische Aktivität besitzen und eine konformationelle Instabilität aufweisen.

In Bezug auf die mutationsspezifische Pathophysiologie der untersuchten Mutationen der MKD, erfüllt die Gruppe der Varianten V203A, V261A, I268T und V377I die Voraussetzungen für die Durchführung einer medikamentösen Therapie mit pharmakologischen Chaperonen. Durch die Stabilisierung der varianten MVK mittels eines pharmakologischen Chaperons könnte die verbleibende Menge an funktioneller MVK erhöht werden. Da sich die residuale Aktivität aus der vorhanden Menge an Protein und dessen

spezifischer Aktivität zusammensetzt, würde dies zur einer Erhöhung der residualen Aktivität in der Zelle und damit zur einer funktionellen Rekonstitution führen (Abb. 16).

Der Vorteil einer solchen Therapie leitet sich aus ihrem Angriffspunkt ab (Abb. 17), der in der frühen Pathophysiologie liegt. Somit könnte einer Störung des Mevalonatstoffwechsels vorgebeugt und die hieraus resultierende Inflammation verhindert werden. Gegenüber der derzeitigen Therapie, die die Inflammation mittels Glucocorticoiden, IL-1 $\beta$ - oder TNF- $\alpha$ -Blockade hemmt (Ter Haar, Oswald et al. 2015), hätte diese neue Therapie den Vorteil, dass sie zur Prävention eingesetzt werden kann. Hierdurch könnten Langzeitkomplikationen wie der Typ AA Amyloidose sowie unerwünschte Arzneimittelwirkungen der Therapie mit Biologika vermieden werden (Rossi-Semerano, Fautrel et al. 2015). Darüber hinaus erscheint vor dem Hintergrund, dass die MVK-Varianten eine erhöhte Thermolabilität aufweisen, die Therapie mit pharmakologischen Chaperonen besonders während der episodischen Fieberschübe der MKD als sinnvoll.

#### MKD Pathophysiologie



**Abbildung 17.** Pharmakologische Chaperone als neuer Therapieansatz für die MKD

Pharmakologische Chaperone, die das fehlgefaltete MVK-Protein stabilisieren, bieten einen potentiellen Therapieansatz, der den Mevalonatstoffwechsel und folglich das inflammatorische Gleichgewicht wiederherstellen können.



Im nächsten Schritt ist die Identifikation möglicher pharmakologischer Chaperone notwendig, wie sie bereits für andere Erkrankungen gelang (Muntau, Leandro et al. 2014). In der Folge müssen diese analog zur PKU *in vitro* (Erlandsen, Pey et al. 2004, Pey, Perez et al. 2004) und *in vivo* (Gersting, Lagler et al. 2010, Lagler, Gersting et al. 2010) getestet und optimiert werden.

### **6.7.2 Stellenwert der anti-inflammatorischen Therapie**

Neben der Hemmung der Inflammation mittels Glucocorticoiden und Biologika nehmen auch die Nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) einen wichtigen Platz in der Therapie der MKD ein. Der Einsatz von NSAR wird während der Fieberepisoden empfohlen, führt jedoch nicht zu deren Verkürzung, sondern dient in erster Linie der Linderung der Symptome (Ter Haar, Oswald et al. 2015). Eine der wichtigsten Wirkungen der NSAR ist die Senkung der Körpertemperatur (Murphy, Myers et al. 1996), weshalb diese primär für die antipyretische Therapie eingesetzt werden. Diese Wirkung wird auch bei MKD genutzt (Plaisance and Mackowiak 2000).

Vorangegangene Studien zur Pathophysiologie konnten zeigen, dass die MVK-Aktivität von Patientenzellen *ex vivo* bei Temperatursteigerung weiter abnimmt und umgekehrt bei Absenkung der Temperatur wieder ansteigt (Houten, Frenkel et al. 2002, Mandey, Schneiders et al. 2006). Darüber hinaus zeigt sich bei HIDS-Patienten eine Steigerung der MVA-Exkretion im Fieberschub (Houten, Kuis et al. 1999). Die in dieser Studie präsentierten Daten unterstützen die Hypothese, dass die varianten Proteine eine erhöhte Thermolabilität aufweisen. Speziell die instabilen Varianten H20P, V261A und I268T zeigten eine deutliche frühere Entfaltung als der MVK-Wildtyp. Die kinetische Untersuchung der stabileren Varianten V203A, A334T und V377I ergab auch eine deutlich verminderte Aktivierungsenergie, die für die Entfaltung notwendig war. Die klinischen und experimentellen Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die erhöhte Körpertemperatur während einer Fieberepisode, die durch eine Aktivierung des Immunsystems entsteht, den Funktionsverlust der MVK zusätzlich verstärkt. Daher erscheint eine Therapie mit NSAR sinnvoll, da die Senkung der Körpertemperatur einer Verstärkung der Entfaltung der varianten MVK in der Zelle vorbeugen könnte. Jedoch sind für die genaue Bedeutung der NSAR in der Therapie weitere Studien erforderlich, um zusätzliche Evidenz für diese Hypothese zu generieren.

## 6.8 Bedeutung und Chancen des neuen MVK-Aktivitätsassays

Die genetische Diagnostik gewinnt aufgrund des technischen Fortschritts an Bedeutung. Mittlerweile lassen sich kostengünstig gesamte Genome auf krankheitsverursachende Mutationen untersuchen. Dies ist eine große Hilfe für die Diagnostik von angeborenen Stoffwechselerkrankungen, setzt aber voraus, dass für die gefundenen Mutationen ausreichend Informationen über die Genotyp-Phänotyp Korrelation bekannt sind, da nur so eine klare Aussage zur Auswirkung der Mutationen getroffen werden kann. Gerade bei neu entdeckten Genen oder neuen Mutationen in bekannten Genen ist die Relevanz für den Metabolismus des Organismus meist nicht eindeutig. Spezifischere Aussagen über die Auswirkungen von Mutationen auf die Proteinexpression und –translation, sowie der damit verbundenen Enzymfunktion, könnte die Bestimmung des Proteoms erlauben. Hierbei wird beispielsweise mittels Massenspektrometrie die Menge von über 4.000 Proteinen in der Zelle gemessen (Kelstrup, Jersie-Christensen et al. 2014). Ist im Falle einer neuen Mutation die Proteinmenge des zugehörigen Proteins reduziert, erhöht dies die Wahrscheinlichkeit der pathophysiologischen Relevanz dieser Mutation. Derzeit ist die Sensitivität der Methode jedoch begrenzt und eine Weiterentwicklung der Analytik notwendig, bevor diese verlässlich in der Diagnostik eingesetzt werden kann (Cayer, Nazor et al. 2016). Eine sensitivere Methode zur Untersuchung von Mutationen in für den Stoffwechsel relevanten Genen sind Enzymaktivitätsassays, die die spezifische Funktion einzelner Enzyme messen.

Gemäß dem Infevers Register (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/> abgerufen am 18. März 2018) (Sarrauste de Menthier, Terriere et al. 2003, Touitou, Lesage et al. 2004) sind mit MKD 132 verschiedene Mutationen im *MVK*-Gen assoziiert und nur zu wenigen gibt es ausreichend experimentelle Daten. Selbst im Fall der häufigsten Mutation V377I zeigt sich, dass der homozygote Zustand bei Patienten zur Krankheit führt, die Ausprägung des Phänotyps jedoch unterschiedlich ausfällt (Messer, Alsaleh et al. 2016). Bei *compound* heterozygoten Genotypen, die bei der MKD häufig auftreten, wird die Prädiktion des Genotyp-Phänotyp Zusammenhangs zusätzlich von Effekten wie der interallelichen Komplementation erschwert. Eine bessere, wenn auch nicht perfekte, Abschätzung liefert die Analyse der residualen Aktivität in Patientenzellen, die mit der Krankheitsschwere korreliert. Gemäß der Studie von Houten et al. lag die residuale Aktivität bei HIDS zwischen 1 und 7 % und bei MA bei < 0,5 % (Houten, Wanders et al. 2000) und konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Somit wird ein valider und präziser Aktivitätsassay weiterhin eine

wichtige Rolle bei der Charakterisierung von varianten MVK-Proteinen und bei der Diagnostik der Erkrankung darstellen. Aufgrund der niedrigen Aktivitäten ist die Sensitivität und Präzision des Assays von großer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuer MVK-Aktivitätsassay auf Basis der Quantifizierung von Mevalonat-5-Phosphat (MVAP) mittels *isotope dilution* UPLC-MS/MS etabliert (Reitzle, Maier et al. 2015). Im Vergleich zur radiochemischen Methode zur Bestimmung der MVK-Aktivität (Hoffmann, Brendel et al. 1992), bietet die Massenspektrometrie praktische Vorteile. Das Arbeiten mit radioaktivem Material ist gefährlich und erfordert die Einhaltung hoher Sicherheitsstandards sowie die Beachtung struktureller und administrativer Regelungen. Die Möglichkeit der Quantifizierung von MVAP und anderen Metaboliten des Mevalonatstoffwechsels mittels HPLC-MS/MS (LLOQ<sub>MVAP</sub> von 4,17 µmol/l) und UPLC-MS/MS konnte bereits in anderen Publikationen gezeigt werden (Henneman, van Cruchten et al. 2008, Henneman, van Cruchten et al. 2011). Im Vergleich hierzu konnten wir die Sensitivität der Quantifizierung von MVAP durch Derivatisierung mit n-butanol signifikant verbessern, sodass die Methode als Grundlage für einen Aktivitätsassay verwendet werden konnte. Die Messung von MVAP war linear für Konzentrationen von 0,5 bis 250 µmol/l und zeigte eine hohe Sensitivität mit einem LLOQ<sub>MVAP</sub> von 5,0 fmol auf der Säule. Die Genauigkeit (*accuracy*) betrug  $\pm 2,7 \%$  und die Impräzision war  $< 11 \%$  und der Assay entsprach damit der *FDA Guidance for industry bioanalytical method validation* (FDA 2001). Der Aktivitätsassay für die MVK wurde auf Basis der radiochemischen Methode erstellt (Hoffmann, Brendel et al. 1992). Jedoch wurde der Phosphat-Puffer durch einen TRIS-HCl-Puffer ersetzt, da das Magnesiumphosphat ( $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ ) während der Probenvorbereitung ausfiel. Wie aus der Literatur bekannt, ist die MVK anfällig gegenüber saurer pH-Werte und benötigt für die Phosphorylierung von Mevalonat (MVA) ATP und  $\text{Mg}^{2+}$  (Potter and Miziorko 1997). In dieser Arbeit wurde diese Beobachtung bestätigt und die MVK-Aktivität war abhängig von ATP und  $\text{Mg}^{2+}$  bis zu Konzentrationen von 2 mmol/l. Höhere Konzentrationen zeigten keinen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms. Die Affinität zum Substrat betrug  $K_m[\text{MVA}]$  von 0,027 mmol/l und ist damit vergleichbar zu veröffentlichten Werten rekombinanter MVK-Proteine (Hinson, Chambliss et al. 1997, Potter and Miziorko 1997, Fu, Voynova et al. 2008), sowie in humanen Fibroblasten (Gibson, Lohr et al. 1989, Hoffmann, Brendel et al. 1992).

Der hier entwickelte MVK-Aktivitätsassay eignet sich folglich zur präzisen Bestimmung der spezifischen Aktivität rekombinanter MVK-Proteine und damit zur Charakterisierung der Auswirkungen von Mutationen auf die funktionellen Eigenschaften des Enzyms. Weiterhin ist die Methode hochdurchsatzgeeignet und könnte bei der Suche nach pharmakologischen Chaperonen eingesetzt werden. Eine Anwendung der Methode für die Bestimmung der residualen Aktivität in Patientenzellen könnte eine neue und robuste Methode für die Diagnostik der MKD darstellen. Gemeinsam mit den *in vitro* Daten sowie den klinischen und biochemischen Daten aus der Literatur, legt der Assay die Grundlage zur Entwicklung eines Werkzeugs zur Vorhersage des Phänotyps, wie es für die PKU bereits entwickelt werden konnte (Danecka, Woidy et al. 2015).

## 7 Zusammenfassung

Die Mevalonatkinase-Defizienz (MKD) ist eine seltene autosomal-rezessive Stoffwechselerkrankung, die durch Mutationen im *MVK*-Gen verursacht wird. Der klinische Phänotyp umfasst ein weites Spektrum vom milden Hyper-IgD-Syndrom (HIDS) bis zur schwerwiegenden Mevalonazidurie (MA). Leitsymptom beider Phänotypen sind periodische Fieberepisoden, die von gastrointestinalen Symptomen, Lymphadenopathie und Arthralgien begleitet werden. Im Rahmen der MA kommt es darüber hinaus zu Entwicklungsverzögerung, neurologischen Symptomen und fazialer Dysmorphie. Pathophysiologisch führt der Funktionsverlust des Mevalonatkinase-Proteins (MVK) zu einer Störung des Mevalonatstoffwechsels mit verminderter Produktion von Isoprenoiden. Hieraus resultiert eine Dysregulation inflammatorischer Signalwege mit erhöhter Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Aufgrund des Fehlens einer spezifischen Therapie ist das Hauptziel die Symptomkontrolle der Inflammation mittels nichtsteroidaler Antirheumatika, Glucocorticoiden, sowie die Blockade von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Während neuere Studien die Entstehung der Inflammation detailliert beschreiben, war zu Beginn der hier vorgelegten Arbeit weitgehend unklar, wie Mutationen im *MVK*-Gen zum Funktionsverlust des MVK-Proteins führen.

Ziel dieser Arbeit war, die Hypothese zu überprüfen, ob es sich bei der Mevalonatkinase-Defizienz um eine genetisch bedingte Proteinfaltungserkrankung mit *loss-of-function* handelt.. Hierfür wurden fünf HIDS- (W188X, V203A, V261A, V377I, H380R) und vier MA-Mutationen (H20P, L264F, I268T, A334T) ausgewählt, die resultierenden varianten MVK-Proteine in *E. coli* produziert und diese nach Aufreinigung funktionell und strukturell charakterisiert.

Die Arbeit ergab folgende zentrale Ergebnisse:

1. *Missense* Mutationen im *MVK*-Gen führen zu einer gestörten nativen Proteinstruktur.
2. *Missense* Mutationen im *MVK*-Gen führen zu verminderter thermischer Stabilität.
3. *Missense* Mutationen im *MVK*-Gen führen nicht zu einer vermehrten temperaturabhängigen Aggregationsneigung.

4. Im Rahmen der Arbeit konnte ein hoch sensibler MVK-Enzymaktivitätsassay entwickelt und angewendet werden, der nun sowohl als Basis für die Untersuchung von Patientenproben als auch zu wissenschaftlichen Zwecken zur Verfügung steht.
5. Mutationen im *MVK*-Gen sind mit unterschiedlicher Enzymaktivität assoziiert. Die spezifische Aktivität am gereinigten Protein ist für ausgewählte Mutationen erhalten, während die Aktivität im zellulären Milieu durch frühzeitige Degradation häufig deutlich niedriger ist.

Diese Ergebnisse sind für das Verständnis der molekularen Mechanismen, die dem Mevalonatkinasemangel zugrunde liegen, von zentraler Bedeutung. Die Eingangshypothese, dass es sich bei der Mevalonatkinase-Defizienz um eine genetisch bedingte Proteinfaltungserkrankung mit *loss-of-function* handelt, konnte bestätigt werden. Damit ist die Grundlage für eine zukünftige Therapie mit pharmakologischen Chaperonen, die den molekularen Krankheitsmechanismus spezifisch adressiert, für einen signifikanten Teil der Patienten gelegt. Die Arbeitsgruppe wird auf der Basis dieser Ergebnisse nun einen *Screen* auf kleine Moleküle, die den molekularen Phänotyp am gereinigten Protein und in Zellkultur korrigieren, durchführen. Entsprechende *Screens* wurden kürzlich erfolgreich für die Phenylketonurie und für den Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel in unserem Labor durchgeführt.

## 8 Literaturverzeichnis

Akula, M. K., M. Shi, Z. Jiang, C. E. Foster, D. Miao, A. S. Li, X. Zhang, R. M. Gavin, S. D. Forde, G. Germain, S. Carpenter, C. V. Rosadini, K. Gritsman, J. J. Chae, R. Hampton, N. Silverman, E. M. Gravalles, J. C. Kagan, K. A. Fitzgerald, D. L. Kastner, D. T. Golenbock, M. O. Bergo and D. Wang (2016). "Control of the innate immune response by the mevalonate pathway." Nat Immunol **17**(8): 922-929.

Ammouri, W., L. Cuisset, S. Rouaghe, M. O. Rolland, M. Delpech, G. Grateau and N. Ravet (2007). "Diagnostic value of serum immunoglobulinaemia D level in patients with a clinical suspicion of hyper IgD syndrome." Rheumatology (Oxford) **46**(10): 1597-1600.

Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of protein chains." Science **181**(4096): 223-230.

Annesley, T. M. (2003). "Ion suppression in mass spectrometry." Clin Chem **49**(7): 1041-1044.

Arkwright, P. D., M. Abinun and A. J. Cant (2007). "Mevalonic aciduria cured by bone marrow transplantation." N Engl J Med **357**(13): 1350.

Arostegui, J. I., J. Anton, I. Calvo, A. Robles, E. Iglesias, B. Lopez-Montesinos, R. Banchereau, S. Hong, Y. Joubert, G. Junge, V. Pascual and J. Yague (2017). "Open-label, Phase II Study to Assess Efficacy and Safety of Canakinumab Treatment in Active Hyperimmunoglobulinemia D with Periodic Fever Syndrome." Arthritis Rheumatol **69**(8): 1679-1688.

Arturo, E. C., K. Gupta, A. Heroux, L. Stith, P. J. Cross, E. J. Parker, P. J. Loll and E. K. Jaffe (2016). "First structure of full-length mammalian phenylalanine hydroxylase reveals the architecture of an autoinhibited tetramer." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(9): 2394-2399.

Bader-Meunier, B., B. Florkin, J. Sibilis, C. Acquaviva, E. Hachulla, G. Grateau, O. Richer, C. M. Farber, M. Fischbach, V. Hentgen, P. Jegou, C. Laroche, B. Neven, T. Lequerre, A. Mathian, I. Pellier, I. Touitou, D. Rabier, A. M. Prieur, L. Cuisset, P. Quartier, Sofremip and Cri (2011). "Mevalonate kinase deficiency: a survey of 50 patients." Pediatrics **128**(1): e152-159.

Balch, W. E., R. I. Morimoto, A. Dillin and J. W. Kelly (2008). "Adapting proteostasis for disease intervention." Science **319**(5865): 916-919.

Balchin, D., M. Hayer-Hartl and F. U. Hartl (2016). "In vivo aspects of protein folding and quality control." Science **353**(6294): aac4354.

Berger, R., G. P. Smit, H. Schierbeek, K. Bijsterveld and R. le Coulter (1985). "Mevalonic aciduria: an inborn error of cholesterol biosynthesis?" Clin Chim Acta **152**(1-2): 219-222.

Beytia, E., J. K. Dorsey, J. Marr, W. W. Cleland and J. W. Porter (1970). "Purification and mechanism of action of hog liver mevalonic kinase." J Biol Chem **245**(20): 5450-5458.

- Bianco, A. M., M. Girardelli, D. Vozzi, S. Crovella, G. Kleiner and A. Marcuzzi (2014). "Mevalonate kinase deficiency and IBD: shared genetic background." Gut **63**(8): 1367-1368.
- Blau, N. (2016). "Genetics of Phenylketonuria: Then and Now." Hum Mutat **37**(6): 508-515.
- Bloch, K. (1965). "The biological synthesis of cholesterol." Science **150**(3692): 19-28.
- Bodar, E. J., L. M. Kuijk, J. P. Drenth, J. W. van der Meer, A. Simon and J. Frenkel (2011). "On-demand anakinra treatment is effective in mevalonate kinase deficiency." Ann Rheum Dis **70**(12): 2155-2158.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Cayer, D. M., K. L. Nazor and N. J. Schork (2016). "Mission critical: the need for proteomics in the era of next-generation sequencing and precision medicine." Hum Mol Genet **25**(R2): R182-R189.
- Cheung, J. C. and C. M. Deber (2008). "Misfolding of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and disease." Biochemistry **47**(6): 1465-1473.
- Chua, C. E., B. Q. Gan and B. L. Tang (2011). "Involvement of members of the Rab family and related small GTPases in autophagosome formation and maturation." Cell Mol Life Sci **68**(20): 3349-3358.
- Crick, F. H. and L. E. Orgel (1964). "The Theory of Inter-Allelic Complementation." J Mol Biol **8**: 161-165.
- Cuisset, L., J. P. Drenth, A. Simon, M. F. Vincent, S. van der Velde-Visser, J. W. van der Meer, G. Grateau, M. Delpech and the International Hyper-IgD Study Group (2001). "Molecular analysis of MVK mutations and enzymatic activity in hyper-IgD and periodic fever syndrome." Eur J Hum Genet **9**(4): 260-266.
- Danecka, M. K., M. Woidy, J. Zschocke, F. Feillet, A. C. Muntau and S. W. Gersting (2015). "Mapping the functional landscape of frequent phenylalanine hydroxylase (PAH) genotypes promotes personalised medicine in phenylketonuria." J Med Genet **52**(3): 175-185.
- Drenth, J. P., L. Cuisset, G. Grateau, C. Vasseur, S. D. van de Velde-Visser, J. G. de Jong, J. S. Beckmann, J. W. van der Meer and M. Delpech (1999). "Mutations in the gene encoding mevalonate kinase cause hyper-IgD and periodic fever syndrome. International Hyper-IgD Study Group." Nat Genet **22**(2): 178-181.
- Drenth, J. P., M. van Deuren, J. van der Ven-Jongekrijg, C. G. Schalkwijk and J. W. van der Meer (1995). "Cytokine activation during attacks of the hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome." Blood **85**(12): 3586-3593.
- Ellis, R. J. and A. P. Minton (2006). "Protein aggregation in crowded environments." Biol Chem **387**(5): 485-497.



Erlandsen, H., A. L. Pey, A. Gamez, B. Perez, L. R. Desviat, C. Aguado, R. Koch, S. Surendran, S. Tying, R. Matalon, C. R. Scriver, M. Ugarte, A. Martinez and R. C. Stevens (2004). "Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(48): 16903-16908.

FDA (2001). "Food and Drug Administration - Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation." Verfügbar unter <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf> [abgerufen am 18. März 2018].

Federici, S., M. P. Sormani, S. Ozen, H. J. Lachmann, G. Amaryan, P. Woo, I. Kone-Paut, N. Dewarrat, L. Cantarini, A. Insalaco, Y. Uziel, D. Rigante, P. Quartier, E. Demirkaya, T. Herlin, A. Meini, G. Fabio, T. Kallinich, S. Martino, A. Y. Butbul, A. Olivieri, J. Kuemmerle-Deschner, B. Neven, A. Simon, H. Ozdogan, I. Touitou, J. Frenkel, M. Hofer, A. Martini, N. Ruperto, M. Gattorno, O. Paediatric Rheumatology International Trials and P. Eurofever (2015). "Evidence-based provisional clinical classification criteria for autoinflammatory periodic fevers." Ann Rheum Dis **74**(5): 799-805.

Frenkel, J., S. M. Houten, H. R. Waterham, R. J. Wanders, G. T. Rijkers, M. Duran, T. W. Kuijpers, W. van Luijk, B. T. Poll-The and W. Kuis (2001). "Clinical and molecular variability in childhood periodic fever with hyperimmunoglobulinaemia D." Rheumatology (Oxford) **40**(5): 579-584.

Frenkel, J., G. T. Rijkers, S. H. Mandey, S. W. Buurman, S. M. Houten, R. J. Wanders, H. R. Waterham and W. Kuis (2002). "Lack of isoprenoid products raises ex vivo interleukin-1 $\beta$  secretion in hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome." Arthritis Rheum **46**(10): 2794-2803.

Fu, Z., N. E. Voynova, T. J. Herdendorf, H. M. Miziorko and J. J. Kim (2008). "Biochemical and structural basis for feedback inhibition of mevalonate kinase and isoprenoid metabolism." Biochemistry **47**(12): 3715-3724.

Fu, Z., M. Wang, D. Potter, H. M. Miziorko and J. J. Kim (2002). "The structure of a binary complex between a mammalian mevalonate kinase and ATP: insights into the reaction mechanism and human inherited disease." J Biol Chem **277**(20): 18134-18142.

Gersting, S. W., K. F. Kemter, M. Staudigl, D. D. Messing, M. K. Danecka, F. B. Lagler, C. P. Sommerhoff, A. A. Roscher and A. C. Muntau (2008). "Loss of function in phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability." Am J Hum Genet **83**(1): 5-17.

Gersting, S. W., F. B. Lagler, A. Eichinger, K. F. Kemter, M. K. Danecka, D. D. Messing, M. Staudigl, K. A. Domdey, C. Zsifkovits, R. Fingerhut, H. Glossmann, A. A. Roscher and A. C. Muntau (2010). "Pahenu1 is a mouse model for tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency and promotes analysis of the pharmacological chaperone mechanism in vivo." Hum Mol Genet **19**(10): 2039-2049.

Gibson, K. M., J. L. Lohr, R. L. Broock, G. Hoffmann, W. L. Nyhan, L. Sweetman, I. K. Brandt, R. S. Wappner and P. I. Bader (1989). "Mevalonate kinase in lysates of cultured human fibroblasts and lymphoblasts: kinetic properties, assay conditions, carrier detection and measurement of residual activity in a patient with mevalonic aciduria." Enzyme **41**(1): 47-55.

Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1990). "Regulation of the mevalonate pathway." Nature **343**(6257): 425-430.

Haas, D. and G. F. Hoffmann (2006). "Mevalonate kinase deficiencies: from mevalonic aciduria to hyperimmunoglobulinemia D syndrome." Orphanet J Rare Dis **1**: 13.

Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science **297**(5580): 353-356.

Hartl, F. U., A. Bracher and M. Hayer-Hartl (2011). "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis." Nature **475**(7356): 324-332.

Henneman, L., M. S. Schneiders, M. Turkenburg and H. R. Waterham (2010). "Compromized geranylgeranylation of RhoA and Rac1 in mevalonate kinase deficiency." J Inherit Metab Dis **33**(5): 625-632.

Henneman, L., A. G. van Cruchten, S. W. Denis, M. W. Amolins, A. T. Placzek, R. A. Gibbs, W. Kulik and H. R. Waterham (2008). "Detection of nonsterol isoprenoids by HPLC-MS/MS." Anal Biochem **383**(1): 18-24.

Henneman, L., A. G. van Cruchten, W. Kulik and H. R. Waterham (2011). "Inhibition of the isoprenoid biosynthesis pathway; detection of intermediates by UPLC-MS/MS." Biochim Biophys Acta **1811**(4): 227-233.

Hinson, D. D., K. L. Chambliss, G. F. Hoffmann, S. Krisans, R. K. Keller and K. M. Gibson (1997). "Identification of an active site alanine in mevalonate kinase through characterization of a novel mutation in mevalonate kinase deficiency." J Biol Chem **272**(42): 26756-26760.

Hinson, D. D., K. L. Chambliss, M. J. Toth, R. D. Tanaka and K. M. Gibson (1997). "Post-translational regulation of mevalonate kinase by intermediates of the cholesterol and nonsterol isoprene biosynthetic pathways." J Lipid Res **38**(11): 2216-2223.

Hinson, D. D., R. M. Ross, S. Krisans, J. L. Shaw, V. Kozich, M. O. Rolland, P. Divry, J. Mancini, G. F. Hoffmann and K. M. Gibson (1999). "Identification of a mutation cluster in mevalonate kinase deficiency, including a new mutation in a patient of Mennonite ancestry." Am J Hum Genet **65**(2): 327-335.

Hoffmann, G., K. M. Gibson, I. K. Brandt, P. I. Bader, R. S. Wappner and L. Sweetman (1986). "Mevalonic aciduria--an inborn error of cholesterol and nonsterol isoprene biosynthesis." N Engl J Med **314**(25): 1610-1614.

Hoffmann, G. F., S. U. Brendel, S. R. Scharfschwerdt, Y. S. Shin, I. M. Speidel and K. M. Gibson (1992). "Mevalonate kinase assay using DEAE-cellulose column chromatography for first-trimester prenatal diagnosis and complementation analysis in mevalonic aciduria." J Inherit Metab Dis **15**(5): 738-746.

Hoffmann, G. F., C. Charpentier, E. Mayatepek, J. Mancini, M. Leichsenring, K. M. Gibson, P. Divry, M. Hrebicek, W. Lehnert, K. Sartor and et al. (1993). "Clinical and biochemical phenotype in 11 patients with mevalonic aciduria." Pediatrics **91**(5): 915-921.

Houten, S. M., J. Frenkel, W. Kuis, R. J. Wanders, B. T. Poll-The and H. R. Waterham (2000). "Molecular basis of classical mevalonic aciduria and the hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome: high frequency of 3 mutations in the mevalonate kinase gene." J Inherit Metab Dis **23**(4): 367-370.

Houten, S. M., J. Frenkel, G. T. Rijkers, R. J. Wanders, W. Kuis and H. R. Waterham (2002). "Temperature dependence of mutant mevalonate kinase activity as a pathogenic factor in hyper-IgD and periodic fever syndrome." Hum Mol Genet **11**(25): 3115-3124.

Houten, S. M., J. Koster, G. J. Romeijn, J. Frenkel, M. Di Rocco, U. Caruso, P. Landrieu, R. I. Kelley, W. Kuis, B. T. Poll-The, K. M. Gibson, R. J. Wanders and H. R. Waterham (2001). "Organization of the mevalonate kinase (MVK) gene and identification of novel mutations causing mevalonic aciduria and hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome." Eur J Hum Genet **9**(4): 253-259.

Houten, S. M., W. Kuis, M. Duran, T. J. de Koning, A. van Royen-Kerkhof, G. J. Romeijn, J. Frenkel, L. Dorland, M. M. de Barse, W. A. Huijbers, G. T. Rijkers, H. R. Waterham, R. J. Wanders and B. T. Poll-The (1999). "Mutations in MVK, encoding mevalonate kinase, cause hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome." Nat Genet **22**(2): 175-177.

Houten, S. M., G. J. Romeijn, J. Koster, R. G. Gray, P. Darbyshire, G. P. Smit, J. B. de Klerk, M. Duran, K. M. Gibson, R. J. Wanders and H. R. Waterham (1999). "Identification and characterization of three novel missense mutations in mevalonate kinase cDNA causing mevalonic aciduria, a disorder of isoprene biosynthesis." Hum Mol Genet **8**(8): 1523-1528.

Houten, S. M., C. S. van Woerden, F. A. Wijburg, R. J. Wanders and H. R. Waterham (2003). "Carrier frequency of the V377I (1129G>A) MVK mutation, associated with Hyper-IgD and periodic fever syndrome, in the Netherlands." Eur J Hum Genet **11**(2): 196-200.

Houten, S. M., R. J. Wanders and H. R. Waterham (2000). "Biochemical and genetic aspects of mevalonate kinase and its deficiency." Biochim Biophys Acta **1529**(1-3): 19-32.

Hübner, C., G. F. Hoffmann, C. Charpentier, K. M. Gibson, B. Finckh, H. Puhl, H. A. Lehr and A. Kohlschütter (1993). "Decreased plasma ubiquinone-10 concentration in patients with mevalonate kinase deficiency." Pediatr Res **34**(2): 129-133.

Ikeda, Y., K. Okamura-Ikeda and K. Tanaka (1985). "Purification and characterization of short-chain, medium-chain, and long-chain acyl-CoA dehydrogenases from rat liver mitochondria. Isolation of the holo- and apoenzymes and conversion of the apoenzyme to the holoenzyme." J Biol Chem **260**(2): 1311-1325.

Jank, J. M., E. M. Maier, D. D. Reibeta, M. Haslbeck, K. F. Kemter, M. S. Truger, C. P. Sommerhoff, S. Ferdinandusse, R. J. Wanders, S. W. Gersting and A. C. Muntau (2014). "The domain-specific and temperature-dependent protein misfolding phenotype of variant medium-chain acyl-CoA dehydrogenase." PLoS One **9**(4): e93852.

- Jeyaratnam, J., N. M. Ter Haar, M. G. de Sain-van der Velden, H. R. Waterham, M. E. van Gijn and J. Frenkel (2016). "Diagnostic Value of Urinary Mevalonic Acid Excretion in Patients with a Clinical Suspicion of Mevalonate Kinase Deficiency (MKD)." JIMD Rep **27**: 33-38.
- Jurczyk, J., M. A. Munoz, O. P. Skinner, R. C. Chai, N. Ali, U. Palendira, J. M. Quinn, A. Preston, S. G. Tangye, A. J. Brown, E. Argent, J. B. Ziegler, S. Mehr and M. J. Rogers (2016). "Mevalonate kinase deficiency leads to decreased prenylation of Rab GTPases." Immunol Cell Biol **94**(10): 994-999.
- Kelstrup, C. D., R. R. Jersie-Christensen, T. S. Batth, T. N. Arrey, A. Kuehn, M. Kellmann and J. V. Olsen (2014). "Rapid and deep proteomes by faster sequencing on a benchtop quadrupole ultra-high-field Orbitrap mass spectrometer." J Proteome Res **13**(12): 6187-6195.
- Kim, Y. E., M. S. Hipp, A. Bracher, M. Hayer-Hartl and F. U. Hartl (2013). "Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis." Annu Rev Biochem **82**: 323-355.
- Kuijk, L. M., J. M. Beekman, J. Koster, H. R. Waterham, J. Frenkel and P. J. Coffe (2008). "HMG-CoA reductase inhibition induces IL-1 $\beta$  release through Rac1/PI3K/PKB-dependent caspase-1 activation." Blood **112**(9): 3563-3573.
- Lagler, F. B., S. W. Gersting, C. Zsifkovits, A. Steinbacher, A. Eichinger, M. K. Danecka, M. Staudigl, R. Fingerhut, H. Glossmann and A. C. Muntau (2010). "New insights into tetrahydrobiopterin pharmacodynamics from Pah enu1/2, a mouse model for compound heterozygous tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency." Biochem Pharmacol **80**(10): 1563-1571.
- Lainka, E., U. Neudorf, P. Lohse, C. Timmann, M. Bielak, S. Stojanov, K. Huss, R. von Kries and T. Niehues (2012). "Incidence and clinical features of hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome (HIDS) and spectrum of mevalonate kinase (MVK) mutations in German children." Rheumatol Int **32**(10): 3253-3260.
- Latz, E., T. S. Xiao and A. Stutz (2013). "Activation and regulation of the inflammasomes." Nat Rev Immunol **13**(6): 397-411.
- Leandro, J., C. Nascimento, I. T. de Almeida and P. Leandro (2006). "Co-expression of different subunits of human phenylalanine hydroxylase: evidence of negative interallelic complementation." Biochim Biophys Acta **1762**(5): 544-550.
- Lobito, A. A., F. C. Kimberley, J. R. Muppidi, H. Komarow, A. J. Jackson, K. M. Hull, D. L. Kastner, G. R. Screaton and R. M. Siegel (2006). "Abnormal disulfide-linked oligomerization results in ER retention and altered signaling by TNFR1 mutants in TNFR1-associated periodic fever syndrome (TRAPS)." Blood **108**(4): 1320-1327.
- Maier, E. M., S. W. Gersting, K. F. Kemter, J. M. Jank, M. Reindl, D. D. Messing, M. S. Truger, C. P. Sommerhoff and A. C. Muntau (2009). "Protein misfolding is the molecular mechanism underlying MCADD identified in newborn screening." Hum Mol Genet **18**(9): 1612-1623.
- Mandey, S. H., L. M. Kuijk, J. Frenkel and H. R. Waterham (2006). "A role for geranylgeranylation in interleukin-1 $\beta$  secretion." Arthritis Rheum **54**(11): 3690-3695.

Mandey, S. H., M. S. Schneiders, J. Koster and H. R. Waterham (2006). "Mutational spectrum and genotype-phenotype correlations in mevalonate kinase deficiency." Hum Mutat **27**(8): 796-802.

Marcuzzi, A., S. Crovella and A. Pontillo (2011). "Geraniol rescues inflammation in cellular and animal models of mevalonate kinase deficiency." In Vivo **25**(1): 87-92.

Marcuzzi, A., A. Pontillo, L. De Leo, A. Tommasini, G. Decorti, T. Not and A. Ventura (2008). "Natural isoprenoids are able to reduce inflammation in a mouse model of mevalonate kinase deficiency." Pediatr Res **64**(2): 177-182.

Marcuzzi, A., D. Vozzi, M. Girardelli, P. M. Tricarico, A. Knowles, S. Crovella, J. Vuch, A. Tommasini, E. Piscianz and A. M. Bianco (2016). "Putative modifier genes in mevalonate kinase deficiency." Mol Med Rep **13**(4): 3181-3189.

Messer, L., G. Alsaleh, P. Georgel, R. Carapito, H. R. Waterham, N. Dali-Youcef, S. Bahram and J. Sibilia (2016). "Homozygosity for the V377I mutation in mevalonate kinase causes distinct clinical phenotypes in two sibs with hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome (HIDS)." RMD Open **2**(1): e000196.

Minoia, F., S. Davi, A. Horne, E. Demirkaya, F. Bovis, C. Li, K. Lehmborg, S. Weitzman, A. Insalaco, C. Wouters, S. Shenoi, G. Espada, S. Ozen, J. Anton, R. Khubchandani, R. Russo, P. Pal, O. Kasapcopur, P. Miettunen, D. Maritsi, R. Merino, B. Shakoory, M. Alessio, V. Chasnyk, H. Sanner, Y. J. Gao, Z. Huasong, T. Kitoh, T. Avcin, M. Fischbach, M. Frosch, A. Grom, A. Huber, M. Jelusic, S. Sawhney, Y. Uziel, N. Ruperto, A. Martini, R. Q. Cron, A. Ravelli, Pediatric Rheumatology International Trials Organization, Childhood Arthritis and Rheumatology Research Alliance, Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group and Histiocyte Society (2014). "Clinical features, treatment, and outcome of macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis: a multinational, multicenter study of 362 patients." Arthritis Rheumatol **66**(11): 3160-3169.

Montero, M. T., J. Matilla, E. Gomez-Mampaso and M. A. Lasuncion (2004). "Geranylgeraniol regulates negatively caspase-1 autoprocessing: implication in the Th1 response against Mycobacterium tuberculosis." J Immunol **173**(8): 4936-4944.

Moura, R., P. M. Tricarico, A. V. Campos Coelho and S. Crovella (2015). "GRID2 a novel gene possibly associated with mevalonate kinase deficiency." Rheumatol Int **35**(4): 657-659.

Munoz, M. A., J. Jurczyk, S. Mehr, R. C. Chai, R. J. W. Arts, A. Sheu, C. McMahon, J. R. Center, D. Singh-Grewal, J. Chaitow, D. E. Campbell, J. M. W. Quinn, K. Alexandrov, Z. Tnimov, S. G. Tangye, A. Simon, T. G. Phan and M. J. Rogers (2017). "Defective protein prenylation is a diagnostic biomarker of mevalonate kinase deficiency." J Allergy Clin Immunol **140**(3): 873-875.e876.

Muntau, A. C. and S. W. Gersting (2010). "Phenylketonuria as a model for protein misfolding diseases and for the development of next generation orphan drugs for patients with inborn errors of metabolism." J Inherit Metab Dis **33**(6): 649-658.

Muntau, A. C., J. Leandro, M. Staudigl, F. Mayer and S. W. Gersting (2014). "Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: pharmacological chaperones and proteostasis regulators." J Inherit Metab Dis **37**(4): 505-523.

Muntau, A. C., W. Röschinger, M. Habich, H. Demmelmaier, B. Hoffmann, C. P. Sommerhoff and A. A. Roscher (2002). "Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria." N Engl J Med **347**(26): 2122-2132.

Murphy, P. J., B. L. Myers and P. Badia (1996). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs alter body temperature and suppress melatonin in humans." Physiol Behav **59**(1): 133-139.

Neven, B., V. Valayannopoulos, P. Quartier, S. Blanche, A. M. Prieur, M. Debre, M. O. Rolland, D. Rabier, L. Cuisset, M. Cavazzana-Calvo, P. de Lonlay and A. Fischer (2007). "Allogeneic bone marrow transplantation in mevalonic aciduria." N Engl J Med **356**(26): 2700-2703.

Niesen, F. H., H. Berglund and M. Vedadi (2007). "The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability." Nat Protoc **2**(9): 2212-2221.

Obici, L., C. Manno, A. O. Muda, P. Picco, A. D'Osualdo, G. Palladini, M. A. Avanzini, D. Torres, S. Marciano and G. Merlini (2004). "First report of systemic reactive (AA) amyloidosis in a patient with the hyperimmunoglobulinemia D with periodic fever syndrome." Arthritis Rheum **50**(9): 2966-2969.

Park, Y. H., G. Wood, D. L. Kastner and J. J. Chae (2016). "Pyrin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS." Nat Immunol **17**(8): 914-921.

Pey, A. L., B. Perez, L. R. Desviat, M. A. Martinez, C. Aguado, H. Erlandsen, A. Gamez, R. C. Stevens, M. Thorolfsson, M. Ugarte and A. Martinez (2004). "Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations." Hum Mutat **24**(5): 388-399.

Plaisance, K. I. and P. A. Mackowiak (2000). "Antipyretic therapy: physiologic rationale, diagnostic implications, and clinical consequences." Arch Intern Med **160**(4): 449-456.

Potter, D. and H. M. Mizioro (1997). "Identification of catalytic residues in human mevalonate kinase." J Biol Chem **272**(41): 25449-25454.

Potter, D., J. M. Wojnar, C. Narasimhan and H. M. Mizioro (1997). "Identification and functional characterization of an active-site lysine in mevalonate kinase." J Biol Chem **272**(9): 5741-5746.

Powers, E. T., R. I. Morimoto, A. Dillin, J. W. Kelly and W. E. Balch (2009). "Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency." Annu Rev Biochem **78**: 959-991.

Prietsch, V., E. Mayatepek, H. Krastel, D. Haas, D. Zundel, H. R. Waterham, R. J. Wanders, K. M. Gibson and G. F. Hoffmann (2003). "Mevalonate kinase deficiency: enlarging the clinical and biochemical spectrum." Pediatrics **111**(2): 258-261.

Ptashne, M. (1992). A genetic switch : phage [lambda] and higher organisms. Cambridge, Mass., Cell Press : Blackwell Scientific Publications.

Reitzle, L., B. Maier, S. Stojanov, D. Teupser, A. C. Muntau, M. Vogeser and S. W. Gersting (2015). "Quantification of mevalonate-5-phosphate using UPLC-MS/MS for determination of mevalonate kinase activity." Clin Biochem **48**(12): 781-787.

Resh, M. D. (2012). "Targeting protein lipidation in disease." Trends Mol Med **18**(4): 206-214.

Rigante, D., G. Emmi, M. Fastiggi, E. Silvestri and L. Cantarini (2015). "Macrophage activation syndrome in the course of monogenic autoinflammatory disorders." Clin Rheumatol **34**(8): 1333-1339.

Rossi-Semerano, L., B. Fautrel, D. Wendling, E. Hachulla, C. Galeotti, L. Semerano, I. Touitou, I. Kone-Paut and the MAIL1 (Maladies Auto-inflammatoires et Anti-IL-1) study Group on the behalf of CRI (Club Rhumatisme et Inflammation) (2015). "Tolerance and efficacy of off-label anti-interleukin-1 treatments in France: a nationwide survey." Orphanet J Rare Dis **10**: 19.

Sarrauste de Menthiere, C., S. Terriere, D. Pugnere, M. Ruiz, J. Demaille and I. Touitou (2003). "INFEVERS: the Registry for FMF and hereditary inflammatory disorders mutations." Nucleic Acids Res **31**(1): 282-285.

Schroder, K. and J. Tschopp (2010). "The inflammasomes." Cell **140**(6): 821-832.

Shanware, N. P., K. Bray and R. T. Abraham (2013). "The PI3K, metabolic, and autophagy networks: interactive partners in cellular health and disease." Annu Rev Pharmacol Toxicol **53**: 89-106.

Shen, N., C. Heintz, C. Thiel, J. G. Okun, G. F. Hoffmann and N. Blau (2016). "Co-expression of phenylalanine hydroxylase variants and effects of interallelic complementation on in vitro enzyme activity and genotype-phenotype correlation." Mol Genet Metab **117**(3): 328-335.

Shi, C. S., K. Shenderov, N. N. Huang, J. Kabat, M. Abu-Asab, K. A. Fitzgerald, A. Sher and J. H. Kehrl (2012). "Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction." Nat Immunol **13**(3): 255-263.

Siemiatkowska, A. M., L. I. van den Born, P. M. van Hagen, M. Stoffels, K. Neveling, A. Henkes, M. Kipping-Geertsema, L. H. Hoefsloot, C. B. Hoyng, A. Simon, A. I. den Hollander, F. P. Cremers and R. W. Collin (2013). "Mutations in the mevalonate kinase (MVK) gene cause nonsyndromic retinitis pigmentosa." Ophthalmology **120**(12): 2697-2705.

Simon, A., E. Drewe, J. W. van der Meer, R. J. Powell, R. I. Kelley, A. F. Stalenhoef and J. P. Drenth (2004). "Simvastatin treatment for inflammatory attacks of the hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome." Clin Pharmacol Ther **75**(5): 476-483.

Simon, A., H. P. Kremer, R. A. Wevers, H. Scheffer, J. G. De Jong, J. W. Van Der Meer and J. P. Drenth (2004). "Mevalonate kinase deficiency: Evidence for a phenotypic continuum." Neurology **62**(6): 994-997.

Simon, A., E. C. Mariman, J. W. van der Meer and J. P. Drenth (2003). "A founder effect in the hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome." Am J Med **114**(2): 148-152.

Stojanov, S., P. Lohse, P. Lohse, F. Hoffmann, E. D. Renner, S. Zellerer, A. Kery, Y. S. Shin, D. Haas, G. F. Hoffmann and B. H. Belohradsky (2004). "Molecular analysis of the MVK and TNFRSF1A genes in patients with a clinical presentation typical of the hyperimmunoglobulinemia D with periodic fever syndrome: a low-penetrance TNFRSF1A variant in a heterozygous MVK carrier possibly influences the phenotype of hyperimmunoglobulinemia D with periodic fever syndrome or vice versa." Arthritis Rheum **50**(6): 1951-1958.

Tahara, M., H. Sakai, R. Nishikomori, T. Yasumi, T. Heike, I. Nagata, A. Inui, T. Fujisawa, Y. Shigematsu, K. Nishijima, K. Kuwakado, S. Watabe and J. Kameyama (2011). "Patient with neonatal-onset chronic hepatitis presenting with mevalonate kinase deficiency with a novel MVK gene mutation." Mod Rheumatol **21**(6): 641-645.

Tchen, T. T. (1958). "Mevalonic kinase: purification and properties." J Biol Chem **233**(5): 1100-1103.

Ter Haar, N. M., J. Jeyaratnam, H. J. Lachmann, A. Simon, P. A. Brogan, M. Doglio, M. Cattalini, J. Anton, C. Modesto, P. Quartier, E. Hoppenreijns, S. Martino, A. Insalaco, L. Cantarini, L. Lepore, M. Alessio, I. Calvo Penades, C. Boros, R. Consolini, D. Rigante, R. Russo, J. Pachlopnik Schmid, T. Lane, A. Martini, N. Ruperto, J. Frenkel and M. Gattorno for the Paediatric Rheumatology International Trials Organisation and Eurofever Project (2016). "The Phenotype and Genotype of Mevalonate Kinase Deficiency: A Series of 114 Cases From the Eurofever Registry." Arthritis Rheumatol **68**(11): 2795-2805.

Ter Haar, N. M., M. Oswald, J. Jeyaratnam, J. Anton, K. S. Barron, P. A. Brogan, L. Cantarini, C. Galeotti, G. Grateau, V. Hentgen, M. Hofer, T. Kallinich, I. Kone-Paut, H. J. Lachmann, H. Ozdogan, S. Ozen, R. Russo, A. Simon, Y. Uziel, C. Wouters, B. M. Feldman, S. J. Vastert, N. M. Wulffraat, S. M. Benseler, J. Frenkel, M. Gattorno and J. B. Kuemmerle-Deschner (2015). "Recommendations for the management of autoinflammatory diseases." Ann Rheum Dis **74**(9): 1636-1644.

Todd, I., P. M. Radford, K. A. Draper-Morgan, R. McIntosh, S. Bainbridge, P. Dickinson, L. Jamhawi, M. Sansaridis, M. L. Huggins, P. J. Tighe and R. J. Powell (2004). "Mutant forms of tumour necrosis factor receptor I that occur in TNF-receptor-associated periodic syndrome retain signalling functions but show abnormal behaviour." Immunology **113**(1): 65-79.

Toplak, N., J. Frenkel, S. Ozen, H. J. Lachmann, P. Woo, I. Kone-Paut, F. De Benedetti, B. Neven, M. Hofer, P. Dolezalova, J. Kummerle-Deschner, I. Touitou, V. Hentgen, A. Simon, H. Girschick, C. Rose, C. Wouters, R. Vesely, J. Arostegui, S. Stojanov, H. Ozdogan, A. Martini, N. Ruperto, M. Gattorno, for the Paediatric Rheumatology International Trials Organisation (PRINTO), Eurotraps and Eurofever Projects (2012). "An international registry on autoinflammatory diseases: the Eurofever experience." Ann Rheum Dis **71**(7): 1177-1182.

Touitou, I., S. Lesage, M. McDermott, L. Cuisset, H. Hoffman, C. Dode, N. Shoham, E. Aganna, J. P. Hugot, C. Wise, H. Waterham, D. Pugnere, J. Demaille and C. Sarrauste de Menthieri (2004). "Infivers: an evolving mutation database for auto-inflammatory syndromes." Hum Mutat **24**(3): 194-198.



- van der Burgh, R., L. Nijhuis, K. Pervolaraki, E. B. Compeer, L. H. Jongeneel, M. van Gijn, P. J. Coffey, M. P. Murphy, P. G. Mastroberardino, J. Frenkel and M. Boes (2014). "Defects in mitochondrial clearance predispose human monocytes to interleukin-1 $\beta$  hypersecretion." *J Biol Chem* **289**(8): 5000-5012.
- van der Hilst, J. C., E. J. Bodar, K. S. Barron, J. Frenkel, J. P. Drenth, J. W. van der Meer, A. Simon and the International AIDS Study Group (2008). "Long-term follow-up, clinical features, and quality of life in a series of 103 patients with hyperimmunoglobulinemia D syndrome." *Medicine (Baltimore)* **87**(6): 301-310.
- van der Meer, J. W., J. M. Vossen, J. Radl, J. A. van Nieuwkoop, C. J. Meyer, S. Lobatto and R. van Furth (1984). "Hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever: a new syndrome." *Lancet* **1**(8386): 1087-1090.
- Vilchez, D., I. Saez and A. Dillin (2014). "The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases." *Nat Commun* **5**: 5659.
- Waters, P. J. (2003). "How PAH gene mutations cause hyper-phenylalaninemia and why mechanism matters: insights from in vitro expression." *Hum Mutat* **21**(4): 357-369.
- Wettstein, S., J. Underhaug, B. Perez, B. D. Marsden, W. W. Yue, A. Martinez and N. Blau (2015). "Linking genotypes database with locus-specific database and genotype-phenotype correlation in phenylketonuria." *Eur J Hum Genet* **23**(3): 302-309.
- Yang, D., L. W. Shipman, C. A. Roessner, A. I. Scott and J. C. Sacchettini (2002). "Structure of the *Methanococcus jannaschii* mevalonate kinase, a member of the GHMP kinase superfamily." *J Biol Chem* **277**(11): 9462-9467.
- Zhang, S. Q., T. Jiang, M. Li, X. Zhang, Y. Q. Ren, S. C. Wei, L. D. Sun, H. Cheng, Y. Li, X. Y. Yin, Z. M. Hu, Z. Y. Wang, Y. Liu, B. R. Guo, H. Y. Tang, X. F. Tang, Y. T. Ding, J. B. Wang, P. Li, B. Y. Wu, W. Wang, X. F. Yuan, J. S. Hou, W. W. Ha, W. J. Wang, Y. J. Zhai, J. Wang, F. F. Qian, F. S. Zhou, G. Chen, X. B. Zuo, X. D. Zheng, Y. J. Sheng, J. P. Gao, B. Liang, P. Li, J. Zhu, F. L. Xiao, P. G. Wang, Y. Cui, H. Li, S. X. Liu, M. Gao, X. Fan, S. K. Shen, M. Zeng, G. Q. Sun, Y. Xu, J. C. Hu, T. T. He, Y. R. Li, H. M. Yang, J. Wang, Z. Y. Yu, H. F. Zhang, X. Hu, K. Yang, J. Wang, S. X. Zhao, Y. W. Zhou, J. J. Liu, W. D. Du, L. Zhang, K. Xia, S. Yang, J. Wang and X. J. Zhang (2012). "Exome sequencing identifies MVK mutations in disseminated superficial actinic porokeratosis." *Nat Genet* **44**(10): 1156-1160.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einigen Menschen meinen Dank für Ihre ausdauernde Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit aussprechen, ohne die diese Promotion nicht zu Stande gekommen wäre.

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Ania C. Muntau für die spannende und lehrreiche Promotionszeit bedanken. Während dieser Zeit wurde meine Begeisterung für die Forschung und die wissenschaftliche Arbeit geweckt. Gerne möchte ich mich auch für die Möglichkeit bedanken, meine Ergebnisse auf einem internationalen Kongress präsentieren zu dürfen und andere Wissenschaftler auf dem Gebiet der Erforschung von Stoffwechselerkrankungen kennenzulernen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Søren Gersting, welcher mich fortwährend in Gesprächen und Diskussionen unterstützt hat. Er hat mich in meiner wissenschaftlichen Entwicklung begleitet und gefördert, sowie mich immer wieder gefordert, über meinen derzeitigen Wissenshorizont hinauszugehen.

Ich möchte Frau PD Dr. med. Silvia Stojanov danken, welche mich für die Immunologie und Rheumatologie begeistert hat, sowie sich ausführlich Zeit genommen hat, meine Arbeit inhaltlich zu begleiten.

Der Arbeitsgruppe am Dr. von Haunerschen Kinderspital in München möchte ich danken, dass sie mich so herzlich aufgenommen hat und keine Mühe gescheut hat, mir die biochemischen Methoden beizubringen. Sie haben meine Zeit im Labor sehr bereichert, sodass ich auch in anstrengenden Zeiten immer gerne zur Arbeit kam.

Expliziter Dank gebührt auch meinen Eltern, welche mich auch in schwierigen und herausfordernden Momenten während meiner Promotion immer mit hilfreichen Ratschlägen, großem Verständnis und noch größerer Geduld unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich noch all meinen langjährigen Freunden danken, die mich während der Promotion begleitet haben und mit mir durch alle Höhen und Tiefen gegangen sind, obwohl sie manchmal auch gerne über andere Themen gesprochen hätten. Trotz der zeitlichen und inhaltlichen Herausforderung konnten wir unsere Freundschaften noch vertiefen, wofür ich sehr dankbar bin.

## **10 Wissenschaftliche Beiträge**

### **10.1 Publikationen**

*Quantification of mevalonate-5-phosphate using UPLC-MS/MS for determination of mevalonate kinase activity.*

Reitzle L\*, Maier B\*, Stojanov S, Teupser D, Muntau AC, Vogeser M, Gersting SW.  
Clinical Biochemistry. 2015 Aug;48(12):781-7.

\* *contributed equally*

### **10.2 Abstracts**

*Protein misfolding in Mevalonate Kinase Deficiency*

Stojanov S, Gersting SW, Reitzle L, Reiß D, Belohradsky BH, Vogeser M, Maier B, Teupser D, Muntau AC.

ISSAID13-1258: Monogenetic autoinflammatory diseases

Pediatr Rheumatol Online J. 2013; 11(Suppl 1): A190.

## Eidesstattliche Versicherung

**Reitzle, Lukas**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

### **Funktionelle und strukturelle Charakterisierung varianter Mevalonatkinase Proteine**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berlin, den 25.01.2019

Ort, Datum

Lukas Reitzle

Unterschrift Doktorandin/ Doktorand

Eidesstattliche Versicherung

Stand: 31.01.2013